Untersuchungen über die Topographie der Proteine und der RNS in den 50S Untereinheiten der Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli mit Hilfe spezifischer Ribonukleoprotein-Partikel

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Chen-Schmeißer
aus Berlin

1976

Untersuchungen über die Topographie der Proteine und der RNS in den 50S Untereinheiten der Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli mit Hilfe spezifischer Ribonukleoprotein-Partikel

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Chen-Schmeißer
aus Berlin

1. Referent: Professor Dr. H.G. Wittmann

2. Referent: Professor Dr. E.R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Zusammenfassung	1
B.	Einleitung und Problemstellung	3
C.	Abkürzungen	14
D.	Material und Methoden	15
1.	Material	15
	Geräte, Chemikalien, Enzyme, ribosomale Proteine, Pufferlösungen, Polyacrylamid-Gelsysteme, Färbelösungen	
2.	Methoden	22
2.1	Präparation von 50S Untereinheiten	22
2.1.1	Nicht radioaktiv markierte Untereinheiten	22
2.1.2	^{3}H-markierte Untereinheiten	22
2.1.3	^{32}P-markierte Untereinheiten	24
2.2	Extraktion ribosomaler Proteine	24
2.2.1	Essigsäureextraktion	24
2.2.2	Extraktion der Proteine durch Hydrolyse der RNS	26
2.3	Extraktion ribosomaler RNS	26
2.4	In vitro Methylierung der Proteine in intakten 50S Untereinheiten	28
2.5	Enzymatische Spaltung der 50S Partikel mit trägergebundener RNase A	30
2.5.1	Hydrolysebedingungen	30
2.5.2	Analyse der Spaltprodukte in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.5.3	Analyse der Spaltprodukte in der Dichtegradienten-Zentrifugation	31
2.5.4	Präparative Isolierung der 13S und der 18S RNPs	31
2.6	Der 5S RNS-Protein Komplex	34
2.6.1	Säulenchromatographische Reinigung des Komplexes	34

Seite

2.6.2 Alkoholfällung 34
2.6.3 Identifizierung der RNS 34
2.6.4 Identifizierung der Proteine 36
2.6.5 Bindung von L5, L18, L25 an die RNS 36
2.6.6 Untersuchungen zur Stöchiometrie der Proteine im 5S RNS-Protein Komplex 37

2.7 Die 13S und 18S RNPs 39
2.7.1 Identifizierung der Proteine in den 13S und 18S RNPs 39
2.7.2 Nachweis für den unspezifischen Austausch von Proteinen 39
2.7.3 Dissoziation unspezifisch gebundener Proteine 39

2.8 Charakterisierung der RNS-Fragmente 40
2.8.1 Der Einfluß von Mg^{2+} auf die Hydrolyse 40
2.8.2 Hydrolyse von ^{32}P-markierten 50S Partikeln 41
2.8.3 Trennung der Fragmente in Polyacrylamid-Gelplatten 41
2.8.4 Elektrophoretische Extraktion der Fragmente aus dem Gel 42
2.8.5 Kombinierte Hydrolyse der Fragmente mit RNase T_1 und alkalischer Phosphatase 44
2.8.6 "Fingerprint"-Analyse 45
2.8.7 Nachspaltung der Oligonukleotide 46

2.9 Präparative Isolierung der 13S, 18S und 11S RNS 47
2.9.1 Hydrolyse der Untereinheiten 47
2.9.2 Zonalzentrifugation 47
2.9.3 Präparative Gelelektrophorese 47

2.10 Bindung von Proteinen an die 13S, 18S und 11S RNS 50
2.10.1 Totale Rekonstitution 50
2.10.2 Bindung von Einzelproteinen 52

E. Ergebnisse 53

1. Die Zugänglichkeit der Proteine im 50S Partikel gegenüber Formaldehyd 53

		Seite
2.	Der native 5S RNS-Protein Komplex	58
2.1	Identifizierung der Proteine und der RNS	58
2.2	Die Stöchiometrie der Proteine im 5S RNS-Protein Komplex	60
3.	Die 13S und 18S Ribonukleoproteine	65
3.1	Isolierung der 13S und 18S RNPs	65
3.2	Der Proteingehalt der 13S und 18S RNPs	68
3.3	Unspezifische Proteinbindung in den Komplexen	71
3.4	Salzbehandlung der 13S und 18S RNPs	73
4.	Die 13S, 18S und 11S RNS sowie kleinere Fragmente der 23S RNS	75
4.1	Der Einfluß von Mg^{2+}-Ionen auf die Hydrolyse der 23S RNS	75
4.2	Größe und Oligonukleotidmuster der RNS-Fragmente	77
4.3	Präparative Isolierung der 13S, 18S und 11S RNS	82
4.4	Unversehrtheit der RNS-Fragmente nach der Gradienten-Zentrifugation	82
5.	Proteinbindungsorte auf der 23S RNS	84
5.1	Die Rekonstitutionsexperimente	84
5.2	Die Proteinbindungstests	88
F.	Diskussion	89
1.	Die Reaktivität der Proteine im 50S Partikel gegenüber Formaldehyd	89
2.	Der 5S RNS-Protein Komplex	90

Seite

3. Die Topographie der Proteine und der RNS im 50S Partikel 91

3.1 Die Zugänglichkeit der RNS in den 50S Untereinheiten gegenüber trägergebundener RNase A 91

3.2 Die Proteinbindungsorte auf der 23S RNS 92

3.3 Die Proteine und die RNS im Bereich der Grenzfläche zur 30S Untereinheit 96

3.4 Die Proteine und die RNS am Bindungsort von EF-G 96

3.5 Nukleationsorte auf der 23S RNS 100

3.6 Die dreidimensionale Struktur des 50S Partikels 101

G. Literaturverzeichnis 104

Lebenslauf

Danksagung

A. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Topographie der Proteine und der RNS in den 50S Untereinheiten des Ribosoms von Escherichia coli analysiert. Ausgehend von zwei verschiedenen Ansätzen wurden Proteine, die in situ von chemischen Reagenzien gut erreicht werden können, und Proteine, die gemeinsam an definierte Fragmente der 23S RNS binden, identifiziert.

Im ersten Teil der Arbeit konnten durch die chemische Umsetzung intakter 50S Untereinheiten mit Formaldehyd und $NaBH_4$ einige Proteine - L1, L5, L7/L12, L11, L25 und L29 - stark reduktiv methyliert werden, während etwa zwei Drittel der Proteine der 50S Untereinheit für die chemische Modifikation relativ unzugänglich waren.

Im zweiten Teil wurden intakte 50S Untereinheiten mit trägergebundener pankreatischer RNase A behandelt. Unter den Hydrolysebedingungen wurde die 23S RNS in zwei große Fragmente (13S und 18S RNS) zerlegt. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation konnten die 5S RNS, die 13S RNS und die 18S RNS zusammen mit den an sie bindenden Proteinen isoliert werden. Der Proteingehalt der Protein-RNS Komplexe wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Nach der beschriebenen Methode konnte die 5S RNS zum ersten Mal zusammen mit den drei Bindungsproteinen L5, L18 und L25 direkt aus dem Ribosom von Escherichia coli isoliert werden. Alle drei Proteine lagen im 5S-RNS-Protein Komplex in stöchiometrisch gleichen Mengen vor. In den 13S und 18S Ribonukleoproteinen waren dagegen fast alle Proteine der 50S Untereinheit nachweisbar. Ihr Vorhandensein in beiden Ribonukleoproteinen beruhte auf dem unspezifischen Austausch von Proteinen während der Präparation der Ribonukleoproteine in Lösungen mit geringer Ionenstärke.

Neben den beiden großen Fragmenten der 23S RNS konnte aus den hydrolysierten 50S Untereinheiten noch ein drittes großes

Fragment (11S RNS) extrahiert werden, das etwa 1100 Nukleotide lang war. Aus den Oligonukleotidkarten ^{32}P-markierter 13S, 18S und 11S RNS ging hervor, daß die 11S RNS ein Subfragment der 18S RNS war und vom 3'-Ende der 23S RNS stammte.

In Proteinbindungstests mit Einzelproteinen wurden die Bindungsorte von 9 Proteinen - L1, L2, L3, L4, L6, L16, L20, L23 und L24 - auf den drei Fragmenten nachgewiesen. Darüber hinaus wurden in Rekonstitutionsversuchen 15 Proteine - L5, L7/12, L8 oder L9, L11, L13, L14, L17, L18, L19, L21, L22, (L25), L27 und (L29) -, die nicht allein an die Fragmente binden konnten, der 13S, der 11S RNS oder der zentralen Region der 23S RNS zwischen den Nukleotiden 1300 und 2000 zugeordnet.

Die Ergebnisse erlaubten es, gewisse Bereiche der 23S RNS als Teile der Grenzfläche der 50S Untereinheit zur 30S Untereinheit, der Peptidyltransferase und des GTPase-Zentrums zu identifizieren. Außerdem ließen sie Rückschlüsse auf den Verlauf der Biosynthese des 50S Partikels aus der RNS und den Proteinen zu, die wahrscheinlich nacheinander an drei Nukleationsorten mit der Anlagerung der primären Bindungsproteine beginnt.

Aus dem Vergleich der linearen Anordnung der Proteine entlang der 23S RNS mit dem dreidimensionalen Modell des 50S Partikels, das mit der Immunelektronenmikroskopie entwickelt worden ist, konnten drei große Bereiche der 23S RNS definierten Regionen im Ribosom zugeordnet werden.

B.1 Einleitung

B.1.1 Das Ribosom des Enterobakteriums Escherichia coli

Ribosomen sind submikroskopisch kleine Partikel, die in jeder lebenden Zelle vorkommen. In ihnen läuft der lebenswichtige Prozeß der Proteinbiosynthese ab, in dem die genetische Information der Nukleinsäuren in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt wird (Translation). Die Ribosomen eukaryontischer Zellen sind etwas größer als die Ribosomen von Bakterien, Cyanophyceen und Zellorganellen (s. Übersichtsartikel von Wittmann, 1976).

Die Ribosomen des Enterobakteriums Escherichia coli sind bisher am genauesten untersucht worden. Über ihre Struktur und Funktion liegen bereits sehr detaillierte Kenntnisse vor. Ihr Molekulargewicht beträgt etwa $2{,}7 \times 10^6$ Dalton (Spirin und Gavrilova, 1969). In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentieren die Ribosomen mit einem Sedimentationskoeffizienten von 70S (Tissières et al., 1959). In Lösungen, die weniger als 2×10^{-3} M Mg^{2+}-Ionen enthalten, zerfällt das 70S Partikel in zwei ungleiche Untereinheiten, die mit 30S und 50S sedimentieren (Tissières et al., 1959).

Die 30S Untereinheit besteht aus der 16S RNS und 21 Proteinen, während die 50S Untereinheit aus der 23S RNS, der 5S RNS und 34 Proteinen besteht (Kurland, 1960; Rosset und Monier, 1963; Kaltschmidt und Wittmann, 1970b). Die Proteine der großen ribosomalen Untereinheit werden L-Proteine (large) genannt und die Proteine der kleinen Untereinheit S-Proteine (small). Entsprechend ihrer Wanderung in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen werden die L-Proteine von 1 bis 34 und die S-Proteine von 1 bis 21 durchnumeriert (Wittmann et al., 1971).

B.1.2 Die Proteinbiosynthese am Ribosom

In einem komplizierten Zusammenwirken der Ribosomen mit der

Messenger-RNS (mRNS), aminoacylierter Transfer-RNS (aa-tRNS), verschiedenen Proteinfaktoren und Energieträgern erfolgt die Übersetzung der genetischen Information in die Proteine (Lengyel, 1974; Ochoa und Mazumder, 1974; Lucas-Lenard und Beres, 1974; Tate und Caskey, 1974). Formal läßt sich der Ablauf der Proteinsynthese in drei Abschnitte gliedern: die Initiation, die Elongation und die Termination.

B.1.2.1 Die Initiation

Die Biosynthese eines Proteins beginnt mit der Ausbildung des 30S Initiationskomplexes, bestehend aus der 30S Untereinheit, den Initiationsfaktoren IF-1, IF-2 und IF-3, formylierter Met-tRNS ($fMet\text{-}tRNS_f^{Met}$), mRNS und GTP. Der Initiationsort auf der mRNS wird wahrscheinlich vom 3'-Ende der 16S RNS unter Mitwirkung des Initiationsfaktors IF-3 und des Proteins S1 erkannt (Shine und Delgarno, 1974; Steitz und Jakes, 1975; van Dieijen et al., 1976), so daß $fMet\text{-}tRNS_f^{Met}$ nur dann an die Initiationscodons AUG oder GUG bindet, wenn sie am Anfang eines Cistrons stehen. Nach Ablösen der Faktoren IF-1 und IF-3 kann sich das 50S Partikel an den Komplex unter Ausbildung des 70S Initiationskomplexes anlagern. Danach dissoziiert IF-2 ab, während gleichzeitig GTP hydrolysiert wird.

B.1.2.2 Die Elongation

Zur Verlängerung der Peptidkette wird aminoacylierte tRNS vom Elongationsfaktor EF-Tu zum Ribosom transportiert. Dies erfolgt in Form des tertiären Komplexes: aa-tRNS~EF-Tu~GTP. Nach der Bindung der aa-tRNS an das Ribosom in der "A-site" (Aminoacyl-tRNS Bindungsort) wird GTP hydrolysiert, das dann als GDP gemeinsam mit EF-Tu vom Ribosom dissoziiert.

Im nächsten Schritt erfolgt die Ausbildung der Peptidbindung zwischen Formyl-Methionin oder einem bereits synthetisierten Peptid, das in der "P-site" (Bindungsort für Peptidyl-tRNS) gebunden ist, und der Aminoacyl-tRNS in der "A-site". Die

Reaktion wird von dem Enzym Peptidyltransferase katalysiert, das integraler Bestandteil des 50S Partikels ist. Für die Reaktion wird keine zusätzliche Energie benötigt.

Nach der Transpeptidierung bleibt die unbeladene tRNS zunächst in der "P-site" gebunden, während sich die Peptidyl-tRNS in der "A-site" des Ribosoms befindet. Unter der katalytischen Wirkung von EF-G wird die deacylierte tRNS aus der "P-site" gelöst, und die Peptidyl-tRNS wird von der "A-site" zur "P-site" des Ribosoms verschoben. Gleichzeitig erfolgt eine Verschiebung zwischen dem Ribosom und der mRNS, so daß ein neues Codon für den nächsten Synthesezyklus bereitsteht. Außerdem wird GTP zu GDP und anorganischem Phosphat hydrolysiert.

B.1.2.3 Die Termination

Der Abschluß der Synthese einer Polypeptidkette wird von den Terminationscodons UAA, UGA und UAG kontrolliert, die von den Terminationsfaktoren (RF-1 und RF-2) erkannt werden. RF-3 und GTP stabilisieren die Bindung der Faktoren RF-1 und RF-2 an das Ribosom. Gemeinsam mit dem Ribosom bewirken sie die Hydrolyse der Polypeptidkette von der tRNS, über die diese im Ribosom verankert war.

B.1.3 Die Feinstruktur des 50S Partikels

Die molekularen Vorgänge der Proteinsynthese werden nur dann auf molekularer Ebene verstanden werden können, wenn die Strukturen aller Einzelkomponenten und ihr Zusammenhalt in der Quarternärstruktur des Ribosoms aufgeklärt sind. Da in dieser Arbeit ausschließlich die 50S Untereinheiten der Ribosomen von Escherichia coli untersucht werden, sollen hier deren wichtigste Strukturdaten zusammengefaßt werden.

B.1.3.1 Die Form des 50S Partikels

Mit physikalischen Methoden konnte die Form des 50S Partikels als abgeflachtes Ellipsoid mit den Maßen 115 Å x 230 Å x 230 Å (Hill et al., 1969) bestimmt werden. Die Ergebnisse von Moore et al. (1974) aus Neutronenbeugungs-Experimenten zeigten außerdem, daß die Verteilung der Proteine und die der RNS in der 50S Untereinheit nicht deckungsgleich sind, so daß eine mit Proteinen angereicherte Region angenommen werden muß. Nach Stuhrmann et al. (1976) umgibt die proteinreiche Region die mit RNS angereicherte Region. Die Massenzentren beider Regionen liegen um etwa 20 Å auseinander.

B.1.3.2 Zugänglichkeit der Proteine im 50S Partikel gegenüber chemischen Reagenzien

Im Gegensatz zum 30S Partikel, in dem keine Unterscheidung zwischen exponierten und geschützten Proteinen getroffen werden konnte, gibt es im 50S Partikel eine Anzahl von Proteinen, die von chemischen Reagenzien relativ schlecht erreicht werden können (Michalski et al., 1973; Hsiung und Cantor, 1973; Litman und Cantor, 1973; Moore und Crichton, 1973). Die Reaktivitätsmuster der Proteine gegenüber den verschiedenen Reagenzien sind jedoch unterschiedlich.

B.1.3.3 Im 50S Partikel benachbarte Proteine

Mit bifunktionellen Reagenzien, z.B. Bis-Methyl-Suberimidat, deren zwei reaktive Gruppen durch lange aliphatische Reste getrennt sind, konnten einige Proteine im 50S Partikel in situ miteinander kovalent verknüpft werden. Diese Dimeren wurden aus den Ribosomen isoliert, so daß ihre Proteine identifiziert werden konnten. Kenny et al. (1975) isolierten die Paare L2-L7/L12, L5-L7/L12 und L17-L32. Expert-Besançon et al. (1975) berichteten außerdem von den Paaren L2-L9 und L10-L11.

B.1.3.4 Die Primärstrukturen der RNS und der Proteine

Die 23S RNS, die aus etwa 3000 bis 3200 Nukleotiden aufgebaut ist, kann als Gerüst betrachtet werden, das die Grundstruktur des 50S Partikels bestimmt und den Zusammenhalt der 34 Proteine und der 5S RNS gewährleistet. Die Primärstruktur der 23S RNS konnte bereits teilweise aufgeklärt werden (Branlant et al., 1975b). Auch die Gesamtsequenz der 5S RNS (Brownlee et al., 1968) und die Aminosäuresequenzen der Proteine L5 (Chen und Ehrke, 1976a), L7/L12 (Terhorst et al., 1972), L10 (Dovgas et al., 1976), L16 (Brosius und Chen, 1976), L18 (Brosius et al., 1975) L25 (Dovgas et al., 1975; Bitar und Wittmann-Liebold, 1975), L26 (Wittmann-Liebold et al., 1976), L27 (Chen et al., 1975), L29 (Bitar, 1974), L30 (Ritter und Wittmann-Liebold, 1975), L32 (Wittmann-Liebold et al., 1975) L33 (Wittmann-Liebold und Pannenbecker, 1976) und L34 (Chen und Ehrke, 1976b) wurden inzwischen bestimmt, und die Sequenzaufklärung weiterer 50S Proteine kann für die nächste Zukunft erwartet werden.

B.1.3.5 Die Bindungsproteine der 5S und der 23S RNS

Drei Proteine, L5, L18 und L25, binden direkt an die 5S RNS (Horne und Erdmann, 1972; Gray et al., 1972; Gray et al., 1973; Yu und Wittmann, 1973), während die Proteine L1, L2, L3, L4, L6, L13, L16, L20, L23 und L24 spezifisch und unabhängig von anderen Proteinen an die 23S RNS binden (Stöffler et al., 1971b; Garrett et al., 1974a). Die Bindungsorte von L1, L20, L23 und L24 konnten bereits auf der 23S RNS lokalisiert werden (Branlant et al., 1973; Branlant et al., 1975a). Die restlichen Bindungsproteine wurden von Spierer et al. (1975) entweder dem 13S oder dem 18S Fragment der 23S RNS zugeordnet. Zusammen mit den Proteinen L5, L18 und L25 kann die 5S RNS einen Komplex mit dem 18S Fragment bilden (referiert von Monier, 1974). Das Bindungsprotein L2 stimuliert die Komplexbildung.

B.1.3.6 Proteine, die den Bindungsproteinen benachbart sind

Es ist relativ wenig über die Einordnung derjenigen Proteine bekannt, die nicht direkt an eines der beiden RNS-Moleküle binden. Versuche, durch milde Nuklease-Behandlung von 50S Untereinheiten Komplexe aus mehreren Proteinen und je einem Subfragment der 23S RNS zu isolieren, waren bisher wenig erfolgreich. Entweder wurden die Ribonukleoproteine (Allet und Spahr, 1971; Kagawa et al., 1972) unter Bedingungen isoliert, bei denen die Gefahr bestand, daß ein unspezifischer Austausch der Proteine zwischen den Komplexen erfolgte (Newton et al., 1975), oder es wurden keine näheren Analysen der RNS in den Komplexen durchgeführt (Roth und Nierhaus, 1975).

B.1.3.7 Die Proteine an der Grenzfläche zur 30S Untereinheit

Einige Proteine konnten an der Grenzfläche des 50S Partikels nachgewiesen werden, die bei der Assoziation der ribosomalen Untereinheiten mit der 30S Untereinheit in Wechselwirkung tritt. Morrison et al. (1973) bestimmten, daß hierzu die Proteine L1, L6, L14, L15, L19, L20, L23 und L27 gehören. Protein L26, das mit dem Protein S20 von der 30S Untereinheit identisch ist, und das bei der Dissoziation der Ribosomen teilweise mit der 50S Untereinheit wandert, gehört ebenfalls zu der Gruppe der "Grenzflächen-Proteine" (referiert von Stöffler, 1974).

B.1.3.8 Der Bindungsort der Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren

Die Proteine L7 und L12 spielen eine wesentliche Rolle bei der Funktion der 50S Partikel bei der Initiation, Elongation und Termination der Proteinbiosynthese. Ihre Anwesenheit in den 50S Untereinheiten ist die Voraussetzung für die Wechselwirkung der Faktoren IF-2, EF-G, EF-Tu, RF-1 und RF-2 mit den 50S Untereinheiten (s. Übersichtsartikel von Möller, 1974). Den direkten Beweis, daß sich die Proteine L7 und L12 am Bin-

dungsort von EF-G befinden, erbrachten Acharya et al. (1973), indem sie EF-G mit L7/L12 kovalent verknüpften.

Eine enge Beziehung zwischen den Proteinen L7/L12 und L10 wiesen Schrier et al. (1973) und Highland und Howard (1975) nach. In partiellen Rekonstitutionsexperimenten zeigten sie, daß der Einbau von L7 und L12 in das 50S Partikel von dem Protein L10 abhängig ist. Das Protein L11 soll nach Highland und Howard (1975) indirekt zur Bindung von L7/L12 beitragen, während es nach Schrier und Möller (1975) wichtig für die EF-G abhängige GTPase Reaktion ist.

B.1.3.9 Die Proteine des GTPase- und des Peptidyltransferase-Zentrums

Das 50S Partikel enthält die aktiven Zentren für zwei wichtige Reaktionen der Proteinbiosynthese: das GTPase- und das Peptidyltransferase-Zentrum (Conway und Lipmann, 1964; Traut und Monro, 1964). Am Aufbau der genannten Reaktionszentren sind mehrere Proteine beteiligt, so daß bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche(s) Protein(e) die Hydrolyse von GTP und welche(s) die Transpeptidierungsreaktion katalysieren.

B.1.3.9a Die GTPase-Aktivität des 5S RNS-Protein Komplexes

Horne und Erdmann (1973) zeigten, daß ein Komplex aus 5S RNS und den Proteinen B-L5 und B-L22 von Bacillus stearothermophilus unabhängig vom Elongationsfaktor EF-G Guanosintriphosphat hydrolysiert. Dieses Ergebnis wurde von Gaunt-Klöpfer und Erdmann (1975) für den 5S RNS-Protein Komplex von Escherichia coli, der die Proteine L18 und L25 enthielt, bestätigt. Roth und Nierhaus zeigten in ihrer Arbeit (1975), daß verschiedene Komplexe aus Proteinen und 5S RNS oder Fragmenten der 5S RNS immer dann GTP hydrolysierten, wenn das Protein L18 in den Komplexen vorhanden war. Da in Affinitätsmarkierungs-Versuchen die Proteine L5, L11, L18 und L30 mit einem

Analog von GDP markiert wurden (Maassen und Möller, 1974), wiesen die vier Resultate gemeinsam darauf hin, daß das Protein L18 die ribosomale GTPase sei. Intakte 5S RNS war für die Reaktion nicht notwendig (Roth und Nierhaus, 1975).

B.1.3.9b Das Peptidyltransferase-Zentrum

Das Problem, welche(s) Protein(e) im Ribosom die Peptidyltransferase ist, ist noch ungelöst. Vorgeschlagen wurden die Proteine L2 (Fahnestock, 1975), L11 (Nierhaus und Montejo, 1973) und L16 (Moore et al., 1974). Nach Auffassung von Moore et al. (1974) erfolgt die Peptidyltransferase-Reaktion unabhängig vom Protein L11, während Dietrich et al. (1974) in ihren Versuchen zeigten, daß L11 an der Peptidyltransferase-Reaktion beteiligt ist, die Reaktion aber von L16 stimuliert wird. Beide Proteine sollten im Ribosom benachbart sein. Funktionell ist auch das Protein L6 mit der Peptidyltransferase verbunden, da es indirekt über L16 eine stimulierende Wirkung auf diese ausübt.

Im Peptidyltransferase-Zentrum wird zwischen dem Bindungsort der Peptidyl-tRNS, der "P-site", und dem Bindungsort der Aminoacyl-tRNS, der "A-site", unterschieden. Mit verschiedenen Analoga der Peptidyl-tRNS wurden bei Affinitätsmarkierungs-Versuchen die Proteine L2 und L27 (Pellegrini et al., 1972; Oen et al., 1973; Czernilofsky et al., 1974a) sowie die Proteine L11 und L18 (Hsiung et al., 1974) und L15 (Czernilofsky et al., 1974b) markiert. Eilat et al. (1974) synthetisierten eine homologe Reihe von Oligopeptidyl-tRNS Molekülen, die sich durch die Längen der Peptidketten unterschieden. Ihre Untersuchungen ergaben, daß L2 dem 3'-Ende der Peptidyl-tRNS am nächsten ist; dann folgt L27, darauf L32 oder L33 und schließlich L24.

Als Proteine in der "A-site" wurden bisher L6 (Pongs et al., 1973a) und L16 (Pongs et al., 1973b) charakterisiert. Faßt man die Ergebnisse aus den verschiedenen Versuchen zusammen,

so gehören die Proteine L2, L6, L11, L15, L16, L18 und L27 zum Peptidyltransferase-Zentrum. Es bleibt abzuwarten, inwieweit die Zugehörigkeit jedes dieser Proteine durch weitere Versuche mit besserer Aussagekraft bestätigt wird.

B.1.3.10 Das elektronenmikroskopische Ribosomenmodell

Die gegenwärtigen Vorstellungen von der Raumstruktur des Ribosoms werden am stärksten von den Ergebnissen der Immun-Elektronenmikroskopie bestimmt (Wabl, 1974; Stöffler und Tischendorf, 1974; Lake et al., 1974; Tischendorf et al., 1975; Lake, 1976). In Übereinstimmung mit physikalischen Daten ist das 50S Partikel globulärer als das 30S Partikel (Abb. 1). In seiner Form ähnelt es einem "Sessel" mit einer "Sitzfläche", einer "Rücken-" und zwei "Armlehnen". Mit der neuen Technik der Immun-Elektronenmikroskopie gelang es, die Lage von 13 der 34 Proteine im 50S Partikel zu kartieren, so daß anhand dieses Modells erste Vorstellungen über die Lokalisation der Funktionszentren im Ribosom entwickelt werden konnten. Mit der elektronenmikroskopischen Technik ist es bisher jedoch unmöglich, Erkenntnisse über den inneren Aufbau der Ribosomen zu gewinnen; so bleiben damit die Fragen unbeantwortet, wie die RNS im Ribosom strukturiert ist, welche dreidimensionalen Strukturen die Einzelproteine im Ribosom einnehmen und wie der Zusammenhalt aller Einzelkomponenten im Ribosom gewährleistet wird.

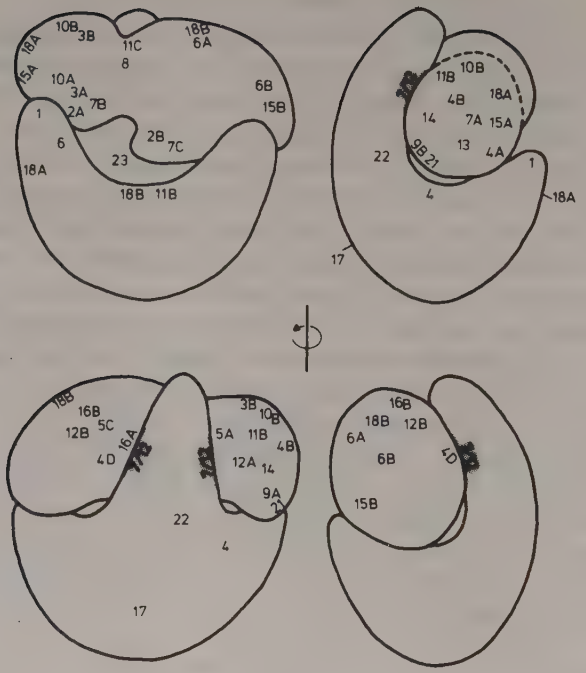


Abbildung 1: Das dreidimensionale Ribosomenmodell der 70S. Die Ribosomen werden in vier Projektionen betrachtet, die entstehen, wenn das Ribosom jeweils um 90° um seine Längsachse gedreht wird (aus Tischendorf et al., 1975).

B.2 Problemstellung

Die Aufklärung der Struktur der Ribosomen aus Proteinen und RNS ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der molekularen Reaktionen bei der Proteinbiosynthese. Zur Strukturanalyse werden verschiedene Techniken angewandt - Elektronenmikroskopie, Sequenzanalyse der Proteine und der RNS, Verknüpfung benachbarter Proteine mit bifunktionellen Reagenzien, Isolierung und Identifizierung von Komplexen aus Proteinen und RNS, Kristallisation der Einzelkomponenten u.a. -.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden mir zwei Aufgaben gestellt:

1) Es sollten die Proteine der 50S Untereinheit identifiziert werden, deren Aminogruppen in situ für chemische Reagenzien erreichbar sind.

2) In den 50S Untereinheiten sollten benachbarte Proteine mit Hilfe definierter Ribonukleoprotein-Partikel identifiziert werden. Bei dieser Methode wird die 23S RNS durch Behandlung der 50S Untereinheiten mit Ribonukleasen in definierte Fragmente zerlegt, die anschließend zusammen mit den Proteinen, die an sie binden, isoliert werden. Die Proteine können dann extrahiert und identifiziert werden. Als Kontrolle für die Spezifität der Protein-RNS Komplexe werden die RNS-Fragmente mit Proteinen der 50S Untereinheit unter spezifischen Salzbedingungen rekonstituiert.

C. Abkürzungen

A	:	Ampère
DNS	:	Desoxyribonukleinsäure
DNase	:	Desoxyribonuklease
EDTA	:	Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz
IpM	:	Impulse pro Minute
KV	:	Kilovolt
mCi	:	Millicurie
N	:	Nukleotid(e)
RNP	:	Ribonukleoprotein (Protein-RNS-Komplex)
RNS	:	Ribonukleinsäure
RNase	:	Ribonuklease
SDS	:	Dodecylsulfat, Natriumsalz
TEMED	:	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TP50	:	Gesamtheit aller Proteine der 50S Untereinheit
Tris	:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
bis-MSB	:	p-bis-(o-Methylstyryl)-Benzol

D.1 Material

D.1.1 Geräte

Zentrifugen: Sorvall Superspeed RC2-B
Beckman L3-50
Beckman L5-65
MSE High Speed 18
Christ Laborzentrifuge

Szintillationszähler: Nuclear Chicago Isocap/300

Proben-Oxidizer: Packard Tri-Carb Sample Oxidizer

Dichtegradientenaustropfer: ISCO Model 640

Photometer: Zeiss Model PM QII
LKB Uvicord II
ISCO Model UA-5

Fraktionssammler: LKB Ultorac Typ 7000

Densitometer: Joyce Loebl Microdensitometer

Bakterienpresse

D.1.2 Enzyme, ribosomale Proteine und Chemikalien

1) Ribonuklease T_1 : Sankyo LTD (Tokio, Japan)
2) Ribonuklease A : Sigma (St. Louis, USA)
3) Enzygel-Ribonuklease : Boehringer (Mannheim)
4) Alkalische Phosphatase : Sigma (St. Louis, USA)
5) Desoxyribonuklease (RNase frei) : Worthington (Freehold, New Jersey)
6) Biogel A-0, 5m : Biorad (Richmond, California)
7) Sephadex G100 : Pharmacia (Uppsala, Schweden)
8) Ficoll 400 : Pharmacia (Uppsala, Schweden)
9) Sucrose (ultra pure) : Schwarz/Mann (Orangenburg, N.Y.)
10) Röntgenfilm (35 x 45 cm) Curix RP 1-PE-FW : Agfa-Gevaert (Belgien)
11) Röntgenfilm-Entwickler G 150 : Agfa-Gevaert (Belgien)
12) Röntgenfilm-Schnellfixierbad G 334 : Agfa-Gevaert (Belgien)
13) Carbo-Sorb™ : Packard (Downers Grove, Ill., USA)
14) Monophase™ : Packard (Downers Grove, Ill., USA)
15) Insta-Gel : Packard (Downers Grove, Ill., USA)
16) PPO-2 : Packard (Downers Grove, Ill., USA)
17) bis-MSB : Packard (Downers Grove, Ill., USA)
18) Phosphor-32 (Orthophosphat : Amersham Buchler (Braunschweig)
19) Mischung tritiierter Aminosäuren : Amersham Buchler (Braunschweig)
20) ^{14}C-Formaldehyd (0,25 mCi/0,75 mg) : NEN (Dreieichenhain)
21) Nitrozellulosefilter : Millipore (Bedford, Mass., USA)
22) 3MM Papier : Whatman (Ralston, England)
23) DEAE-Zellulose : Whatman (Ralston, England)

24) Cellulose Acetate : Oxoid (London, England)

25) Acrylamid : Shell Chemicals

26) NN'-Methylen-Bis-Acrylamid : Serva (Heidelberg)

27) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin) : Fluka AG, (Buchs, Schweiz)

28) SDS (Dodecylsulfat Na-salz) : Serva (Heidelberg)

29) Casamino acids : Difco (Detroit, Michigan)

30) Bromphenolblau : Merck (Darmstadt)

31) Pyronin G : Merck (Darmstadt)

32) Toluidin Blau O : Merck (Darmstadt)

33) Coomassie Brilliant Blau : Serva (Heidelberg)

34) Amidoschwarz 10B : Merck (Darmstadt)

35) Xylen Cyanol, Farbindikator : Searle (High Wycombe, Bucks., England)

36) Aluminiumoxyd A 305 : Alcoa Chemicals (Arkansas)

37) Triäthylamin : Merck-Schuchardt (Darmstadt)

Einzelproteine der ribosomalen 50S Untereinheit von Escherichia coli wurden von Herrn Prof. H.G. Wittmann für die Experimente zur Verfügung gestellt.

D.1.3 Pufferlösungen

1) TM_1K_{100} : Hydrolysepuffer : 0.01 Tris-HCl, pH 7.4; 0.001 M $MgAc_2$ und 0.1 M KCl

2) TMA I : 0.01 M Tris-HCl, pH 7.8; 0.01 M $MgCl_2$; 0.03 M NH_4Cl und 0.006 M ß-Mercaptoäthanol

3) TMA II : 0.01 M Tris-HCl, pH 7.8; 0.3 mM $MgCl_2$; 0.03 M NH_4Cl und 0.006 M ß-Mercaptoäthanol

4) TMK : 0.03 M Tris-HCl, pH 7.4; 0.02 M $MgCl_2$; 0.35 M KCl und 0.006 M ß-Mercaptoäthanol

5) BMK : 0.1 M K-Borat-Puffer, pH 8.5 (= 6,2 g Borsäure + 0.1 g di-Natriumtetraborat + KOH auf pH 8.5 titriert); 0.3 mM $MgCl_2$ und 0.02 KCl

6) SDS-Gelpuffer (0.2 M; pH 7.2) : 7.8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 38,6 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ und 2 g SDS auf 1 l H_2O

7) SDS-Elektrophoresepuffer (0.1 M; pH 7.2) : 1 Teil SDS-Gelpuffer + 1 Teil H_2O

8) Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (0.089 M; pH 8.5) : 10.8 g Tris + 5.5 g Borsäure auf 1 l H_2O

9) Bakterien-Waschpuffer : 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, und 0.01 M $MgAc_2$

10) Rohextraktpuffer : 0.01 M Tris-Hcl, pH 7.8; 0.01 M $MgCl_2$; 0.06 M KCl und 0.006 M ß-Mercaptoäthanol

11) Dissoziationspuffer : 0.01 M K-Phosphatpuffer, pH 7.4 (1 M K-Phosphat = 700 ml 1 M K_2HPO_4 + 250 ml 1 M KH_2PO_4, pH 7.4); 0.001 M $MgCl_2$ und 0.006 M ß-Mercaptoäthanol

D.1.4. Polyacrylamid-Gelsysteme

Vorschrift für Polyacrylamid-Gele unterschiedlicher Porosität

Lösungen	Endkonzentration					
	3 %	3 %	4 %	6,5 %	8,0 %	12,5 %
Acrylamid A	46,5	46,5	-	-	-	-
B	-	-	20,0	32,5	40,0	62,5
H_2O	49,2	43,2	69,7	63,2	55,4	26,9
1 M Tris-HCl pH 7,4	4,0	-	-	4,0	4,0	-
Tris-Borat pH 8,5	-	10,0	10,0	-	-	10,0
Persulfat A	0,3	0,3	0,3	0,3	-	-
B	-	-	-	-	0,6	0,6
TEMED	0,07	0,07	0,16	0,16	0,16	0,16

Jede Kolonne gibt die Lösungen in Millilitern an. Das Gesamtvolumen aller Ansätze beträgt 100 ml. Wenn neben Tris-HCl Puffer andere Salze im Gel waren, wurde weniger H_2O und stattdessen entsprechende Mengen einer 1 M Salzlösung (z.B. 1 M $MgCl_2$) eingesetzt.

Stammlösungen:

Acrylamid A : 6,4%ig (60g Acrylamid + 4,5 g Bisacrylamid auf 1 Liter H_2O)

Acrylamid B : 20%ig (190 g Acrylamid + 10 g Bisacrylamid auf 1 Liter H_2O)

Persulfat A : 10%iges Ammoniumperoxodisulfat

Persulfat B : 7%iges Ammoniumperoxodisulfat

Tris-Borat, pH 8.5 : 108 g Tris + 55 g Borsäure auf 1 l H_2O

8-molare Harnstoffgele:

Die 8-molaren Harnstoffgele unterschieden sich von den einfachen Polyacrylamid-Gelen nur darin, daß sämtliche Lösungen in 8-molarem Harnstoff angesetzt wurden.

Vorschrift für 12%ige SDS-Gele:

Stammlösungen	Zusammensetzung der Stammlösungen	ml
33% Acrylamid	31,4 g Acrylamid + 1,6 g Bisacrylamid in 100 ml H_2O	36,4
Gelpuffer, 0,2 M	7,8 g NaH_2PO_4 + 38,6 g Na_2HPO_4 + 2 g SDS in 1 Liter H_2O	50,0
H_2O		13,4
5% Ap	0,5 g Ammoniumperoxodisulfat in 10 ml H_2O	0,2
TEMED		0,14

D.1.5 Färbelösungen

Amidoschwarz (protein-spezifisch)

Zusammensetzung: 0,5% Amidoschwarz
5,0% Essigsäure

Die Gele werden 5 Minuten gefärbt und 24 Stunden in 5%iger Essigsäure entfärbt.

Coomassie Brilliant Blau (protein-spezifisch)

Zusammensetzung: 0,1% Coomassie Brilliant Blau
7,5% Essigsäure

Die Gele wurden je nach ihrer Konzentration 3-60 Minuten (SDS-Gele 8 Stunden) gefärbt. Sie wurden anschließend in 5%iger Essigsäure entfärbt.

Pyronin G (RNS-spezifisch)

Zusammensetzung: 10,0 g Lanthanacetat
5,0 g Pyronin G
75,0 ml Essigsäure sowie
H_2O ad 500 ml

Die Gele wurden 12 Stunden gefärbt und 12-24 Stunden in 5%iger Essigsäure entfärbt.

Toluidin Blau (RNS-spezifisch)

Zusammensetzung: 0,1% Toluidin Blau O
7,5% Essigsäure

Die Gele wurden 20 Minuten gefärbt, dann 30 Minuten in 5%iger Essigsäure entfärbt und in 1%iger Essigsäure aufbewahrt.

D.2 Methoden

D.2.1 Präparation von 50S Untereinheiten

D.2.1.1 Nicht radioaktiv markierte Untereinheiten

Ribosomen wurden von Escherichia coli K 12, Stamm A19, RNase$^-$ (Gesteland, 1966) isoliert. Dazu wurden die Bakterien in einem reichen Medium gezüchtet, bis sie das zweite Drittel der logarithmischen Wachstumsphase erreicht hatten. Durch Zentrifugieren wurden die Zellen geerntet. Dann wurden ihre Zellwände unter hohem Druck (8000 kg/cm^2, Bakterienpresse) gesprengt und aus dem entstandenen Homogenat die Ribosomen in mehreren Zentrifugationen isoliert. Diese wurden in Dissoziationspuffer (D.1.3) aufgenommen und in einer 12stündigen Dialyse in ihre Untereinheiten dissoziiert. Die Trennung der 30S und 50S Untereinheiten erfolgte in einem Dichtegradienten aus 6,8 - 38%iger Saccharose in einem Beckman XV Ti Zonalrotor (Eickenberry et al., 1970). Durch Ultrazentrifugation oder Polyäthylenglykolfällung (Expert-Bezançon et al., 1974) wurden die Ribosomenpartikel aus der Saccharoselösung gewonnen.

D.2.1.2 ^{3}H-markierte Untereinheiten

Mit Tritium markierte 50S Partikel wurden nach der von Muto et al. (1974) beschriebenen Methode isoliert, indem Zellen von E. coli A19 (Gesteland, 1966) in Gegenwart von 5 mCi einer Mischung aus tritiierten Aminosäuren bei 37°C in 500 ml Medium gezüchtet wurden.

Das Nährmedium enthielt in 1 Liter:

7,00 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
3,00 g K_2HPO_4
0,50 g NaCl
1,00 g NH_4Cl
1,32 g $(NH_4)_2SO_4$

0,39 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,15 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
4,00 g Glucose
0,20 g Casamino acids

In dem Medium wuchsen die Zellen bis zu einer Absorption von 0,25 bei 560 nm. Abbildung 2 zeigt die typische Wachstumskurve von E. coli A19. Nach Erreichen einer Absorption von 0,18 wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugieren (Christ Zentrifuge) geerntet. Sie wurden zweimal mit Bakterien-Waschpuffer (D.1.3) gewaschen und dann mit einer doppelten Menge Aluminiumoxyd in der Kälte (4°C) zerrieben. Die aufgebrochenen Zellen und das Aluminiumoxyd wurden in 8 ml Rohextraktpuffer (D.1.3) suspendiert, der DNase (RNase frei, 1 µg/ml) enthielt. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 16 000 UpM zentrifugiert (Sorvall). Der Überstand wurde auf Eis aufbewahrt, während das Sediment erneut gemörsert und mit Rohextraktpuffer extrahiert wurde. Die Überstände aus beiden Zentrifugationen wurden vereinigt. Aus ihnen wurden die ^3H-markierten 70S Ribosomen durch Ultrazentrifugation (45 000 UpM, 5 1/2 Stunden) gewonnen.

Die Ribosomen wurden in 1 ml TMA II Puffer (D.1.3) gelöst und 6 Stunden in diesem Puffer dissoziiert. Ihre 30S und 50S Untereinheiten wurden in einem linearen Dichtegradienten aus 10-40%iger Saccharose in TMA II getrennt. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 25 ml. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW 25.1 Rotor (Beckman) bei 20 000 UpM und dauerte 15 Stunden. Abbildung 3 zeigt die Trennung der ribosomalen Untereinheiten. Zum Nachweis der Ribosomenpartikel wurden je 2 µl aus jeder Fraktion entnommen, mit 5 ml Insta-Gel gemischt und im Szintillationszähler gezählt.

Nachdem die ribosomalen Untereinheiten im Gradienten lokalisiert waren, wurden die 50S Partikel gesammelt und mit 4 mg "kalten" 50S Untereinheiten versetzt. Schließlich wurde die Probe mit TMA I Puffer (D.1.3) auf 38 ml verdünnt. Die 50S Un-

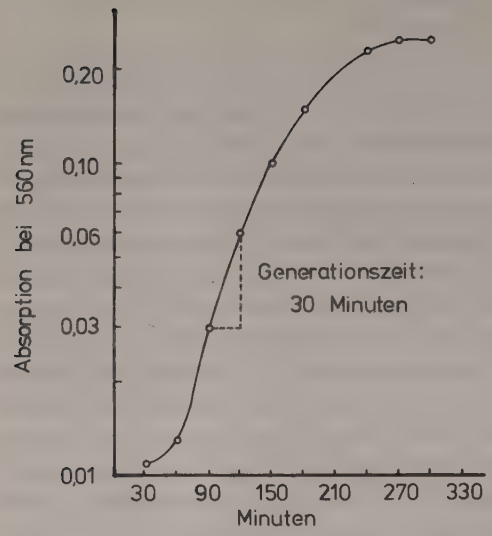


Abbildung 2:

Wachstumskurve von E. coli A19 in Gegenwart von tritierten Aminosäuren.

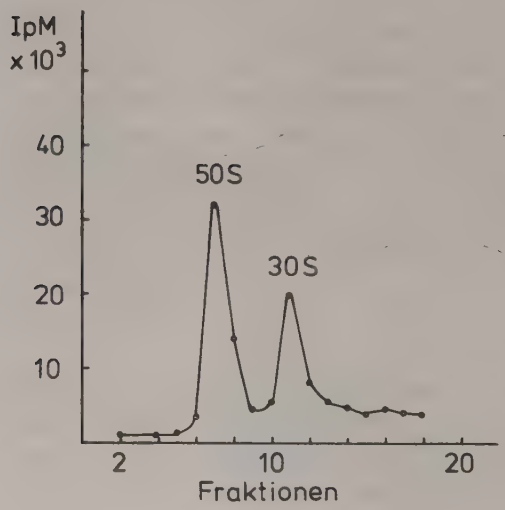


Abbildung 3:

Trennung von ^{3}H-markierten 30S und 50S Untereinheiten in einem 10-40%igen Saccharosegradienten.

tereinheiten ließen sich so quantitativ sedimentieren (50 000 UpM, 14 Stunden, 4°C).

D.2.1.3 ^{32}P-markierte Untereinheiten

^{32}P-markierte 70S Ribosomen wurden aus E. coli A19 Zellen isoliert, denen als einzige Phosphatquelle ^{32}P-Orthophosphorsäure im Nährmedium angeboten wurde (Fellner, 1969). Die Extraktion der Ribosomen aus den Zellen und die Trennung der Untereinheiten wurden wie unter D.2.1.2 durchgeführt.

Nachdem die Fraktionen des Saccharosegradienten, die 50S Untereinheiten enthielten, vereinigt worden waren, wurden sie zur Verminderung der Saccharosekonzentration mit einem gleichen Volumen TMA II Puffer (D.1.3) verdünnt. Dann wurden 1/100 Volumen 1 M $MgCl_2$ hinzupipettiert und das Ganze mit 0,7 Volumen Äthanol (-20°C) präzipitiert. Zur Verhinderung der Aggregatbildung wurden die 50S Partikel sofort bei 17 000 UpM (MSE) abzentrifugiert.

D.2.2 Extraktion ribosomaler Proteine

D.2.2.1 Essigsäureextraktion

10 mg 50S Untereinheiten wurden in 1 ml kaltem TMA I Puffer (4°C) (D.1.3) gelöst, auf Eis gestellt und mit 1/10 Volumen 1 M $MgCl_2$ versetzt. Dann wurden die Proteine unter ständigem Rühren in 67%iger Essigsäure von der RNS gelöst (Hardy et al., 1969). Nach zwei Stunden wurde die RNS abzentrifugiert (Christ Zentrifuge). Der Überstand mit den Proteinen wurde auf das vierfache Volumen mit $H_2O_{bidest.}$ verdünnt und stufenweise zuerst gegen 10%ige dann gegen 5- und 1%ige Essigsäure dialysiert. Schließlich wurden die Proteine lyophilisiert und in einem möglichst kleinen Volumen $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen. Die Konzentration der Proteine wurde mit dem Folin-Ciocalteu-Test bestimmt (Lowry et al., 1951).

D.2.2.2 Extraktion der Proteine durch Hydrolyse der RNS

Proteine von 50S Partikeln und von RNPs, deren Proteingehalt in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a) analysiert werden sollte, wurden durch totale Hydrolyse aus ihrer Bindung an die Partikel befreit. 5 mg 50S Untereinheiten oder eine äquivalente Menge der RNPs wurden mit 60/ug RNase A und 50 Einheiten RNase T_1 30 Minuten bei 37°C in 0.1 mM EDTA und 0.1 mM NaCl verdaut. Dann folgte eine 16stündige Dialyse gegen 0.1 mM NH_4HCO_3 zur Entfernung nichtflüchtiger Salze und der RNS Bruchstücke. Darauf wurden die Proteine lyophilisiert und elektrophoretisch in Polyacrylamid-Gelplatten nach Kaltschmidt und Wittmann (1970a) getrennt. Abbildung 4 zeigt das Proteinmuster der 50S Untereinheiten nach der Extraktion mit Ribonukleasen. Es unterscheidet sich nicht von 50S Partikeln, die mit Essigsäure (D.2.2.1) extrahiert wurden.

D.2.3 Extraktion ribosomaler RNS

Die 23S und die 5S RNS wurden durch Phenol-SDS-Behandlung von den 50S Untereinheiten bzw. von 5S RNS-Protein Komplexen extrahiert (Kurland, 1969). 5 mg 50S Untereinheiten wurden in 1 ml sterilen 0.1 M NaAc Puffer, pH 5.0, gelöst und mit 0.6 ml 0.1%iger SDS-Lösung (0.1 g SDS in 100 ml 0.1 M NaAc Puffer, pH 5.0) versetzt. Das Ganze wurde geschüttelt und 5 Minuten auf Eis stehengelassen. Zu dem Gemisch wurden 1.6 ml destilliertes Phenol (Kp = 182°C), das ebenfalls mit 0.1 M NaAc Puffer, pH 5.0, gesättigt war, hinzugefügt und 15 Minuten sehr heftig bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dann wurde die wässrige Phase mit der RNS von der Phenolphase durch Zentrifugieren (Christ Zentrifuge, Ausschwingrotor) getrennt. Die Pufferlösung wurde noch zweimal mit frischem Phenol behandelt. Danach wurde sie zweimal mit einem halben Volumen Diäthyläther extrahiert. Die RNS wurde mit einem doppelten Volumen Äthanol 24-48 Stunden bei -20°C aus der Lösung ausgefällt.

Abbildung 4: Proteinmuster von 50S Untereinheiten nach der Extraktion der Proteine mit einer Mischung aus RNase T_1 und pankreatischer RNase. Die Proteine wurden zweidimensional in Polyacrylamid-Gelen nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann (1970a) getrennt.

D.2.4 In vitro Methylierung der Proteine in intakten 50S Untereinheiten

Aliphatische Aldehyde reagieren sehr schnell in einer Gleichgewichtsreaktion mit α- und ε-Aminogruppen von Proteinen unter Ausbildung von Schiff'schen Basen (Means und Feeney, 1968; Rice und Means, 1970). Durch Reduktion mit milden Reduktionsmitteln, z.B. $NaBH_4$, können die Schiff'schen Basen in stabile Alkylamine überführt werden.

$$P\text{-}NH_2 + RHCO \underset{+H_2O}{\overset{-H_2O}{\rightleftharpoons}} P\text{-}N{=}CHR \xrightarrow{H_2} P\text{-}NH\text{-}CH_2R$$

Die Reaktion ist sehr stark pH-abhängig. Die besten Ergebnisse werden bei pH 9 und 0°-4°C erzielt. wird bei der Umsetzung Formaldehyd als Carbonylverbindung verwendet, so werden die Aminogruppen weitgehend dimethyliert.

$$P\text{-}NH_2 + 2\ H_2CO + 1/2\ NaBH_4 \xrightarrow[pH\ 9]{0^\circ C}$$

$$P\text{-}N(CH_3)_2 + 1/2\ NaH_3BO_3 + 1/2\ H_2O$$

Die pK-Werte der dimethylierten Aminogruppen der Proteine (= tertiäre Amine) liegen ungefähr 0.5 pH-Einheiten unter denen der primären Amine. Wegen der geringen Änderung in der Basizität und wegen des relativ geringen Raumes, den die Methylreste einnehmen, sind die methylierten Proteine den nicht-methylierten sehr ähnlich. So haben methylierte Bindungsproteine von E. coli Ribosomen eine unveränderte Affinität zur RNS, und 30S Untereinheiten, die aus methylierten Proteinen rekonstituiert worden sind, zeigen dieselbe Aktivität im Poly-U-abhängigen Polyphenylalanin-Synthesetest (Moore und Crichton, 1973).

D.2.4.1 Radioaktive Methylierung der Proteine

1,9 mg 50S Untereinheiten wurden in 1 ml BMK-Puffer (D.1.3) gelöst und 16 Stunden gegen denselben Puffer bei 4°C dialysiert. Nach Abkühlen der Probe auf 0°C wurde 1%ige ^{14}C-Formaldehydlösung (250 mCi/0.075 mg CHO) in 5-molarem Überschuß hinzugefügt. Innerhalb von 1 Minute folgten zweimal je 10 µl $NaBH_4$ (10 mg/ml) unter gleichzeitigem kräftigen Schütteln der Probe. Um eine vollständige Reduktion des Formaldehyds zu gewährleisten, wurden nach 10 Minuten noch einmal 10 µl $NaBH_4$-Lösung in die Probe pipettiert. Überschüssige Reagenzien wurden während einer 36stündigen Dialyse gegen 20 mM KCl entfernt. Danach wurden 3 mg nichtmarkierte 50S Partikel zur Probe hinzugefügt und noch einmal 12 Stunden gegen 0.1 mM EDTA und 0.1 mM NaCl dialysiert. Dann wurden die Proteine extrahiert (D.2.2.2) und analysiert (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a).

D.2.4.2 Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität

Nach dem Entfärben der zweidimensionalen Gelplatten (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a) wurden die Proteinflecke ausgeschnitten und 48 Stunden bei 70°C im Trockenschrank getrocknet. Danach wurden sie in Gegenwart von reinem Sauerstoff im Proben Oxidizer verbrannt. Unter den gegebenen Bedingungen wird der Kohlenstoff der Proteine zu Kohlendioxyd oxidiert. Das CO_2 wird in dem Gerät von einem speziellen Lösungsmittel (Carbo-Sorb™) gebunden und kann nach Mischen mit Szintillationslösung im Szintillationszähler auf seine Radioaktivität analysiert werden.

Szintillationslösung:	15 g	PPO-2
	2 g	bis-MSB
	110 ml	Äthanol

Die Mischung wird mit Toluol auf 1 Liter aufgefüllt.

D.2.5 Enzymatische Spaltung der 50S Partikel mit trägergebundener RNase A

Wenn intakte 50S Untereinheiten unter sehr milden Bedingungen mit trägergebundener RNase A (Enzygel) behandelt werden, wird die 23S RNS nur an einer Stelle der Oligonukleotidkette gespalten (Allet und Spahr, 1970; Saha, 1974; Spierer et al., 1975). RNase A spaltet entweder hinter einem Uracil- oder einem Cytidin-Nukleotid: HO-Np-Cp$\downarrow$Np-Up$\downarrow$Np. Die beiden resultierenden Fragmente sind etwa 1300 Nukleotide (vom 5'-Ende der 23S RNS) und 1800 Nukleotide (vom 3'-Ende der 23S RNS) lang. Definitionsgemäß werden sie 13S und 18S RNS genannt. Zusammen mit Proteinen der 50S Untereinheit bilden sie die 13S und 18S RNPs.

D.2.5.1 Hydrolysebedingungen

50S Partikel wurden in TM_1K_{100}Puffer gelöst und 16 Stunden bei 4°C gegen denselben Puffer dialysiert. Sie wurden anschließend bei einer Konzentration von 4 mg/ml nach der Methode von Allet und Spahr (1970) unter leicht veränderten Bedingungen mit trägergebundener RNase A (Enzygel) 30 Minuten bei 0°C beim Enzym-Substratverhältnis = 1/3000 (Gewicht/Gewicht) verdaut. Die Hydrolyse wurde durch 10minütiges Zentrifugieren bei 10 000 UpM (Sorvall) beendet. Der Überstand mit den verdauten 50S Untereinheiten wurde vorsichtig abdekantiert und sofort mit einem gleichen Volumen 4 M LiCl in TM_1K_{100} (D.1.3) versetzt. Anschließend wurde die Probe 6 Stunden bei 45 000 UpM in einem 50 Ti Rotor (Beckman) zentrifugiert. Restliche Spuren löslicher RNase A verblieben bei dieser Behandlung im Überstand. Das Sediment wurde in 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

D.2.5.2 Analyse der Spaltprodukte in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Hydrolyse wurden die Spaltprodukte elektrophoretisch in 3%igen Polyacrylamid-Gelen (Durchmesser = 0,7 cm, Länge = 7,0 cm) (D.1.4) getrennt. Der Elektrophoresepuffer enthielt 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA. Je 0.022 mg der hydrolysierten 50S Untereinheiten wurden zusammen mit dem Farbstoff Bromphenolblau, der zur Frontmarkierung diente, aufgetragen. Die Elektrophorese (3 mA/Röhrchen) wurde so lange laufengelassen, bis das Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte. Gefärbt wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blau (D.1.5).

D.2.5.3 Analyse der Spaltprodukte in der Dichtegradienten-Zentrifugation

Ein Aliquot des Hydrolysats (1 mg) wurde durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation analysiert (Allet und Spahr, 1970). Der Gradient (Gesamtvolumen = 36 ml) enthielt 5-20%ige Saccharose (Gewicht pro Volumen) in 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA. Die Zentrifugation dauerte 24 Stunden bei 24 000 UpM und 4°C in einem SW 27 Rotor (Beckman). Nach Beendigung des Laufs wurde der Gradient in einem ISCO Dichtegradientenaustropfer ausgetropft und gleichzeitig bei 260 nm vermessen. Abbildung 5 zeigt die Verteilung der 13S und 18S RNPs im Gradienten.

D.2.5.4 Präparative Isolierung der 13S und 18S RNPs

Zur Isolierung großer Mengen der 13S und 18S RNPs wurden 150 mg 50S Untereinheiten mit 0.033 mg pankreatischer RNase A (Enzygel) unter den beschriebenen Bedingungen verdaut (D.2.5.1). Nach Beendigung der Hydrolyse wurde die Probe entweder wie beschrieben mit einem gleichen Volumen 4 M LiCl in TM_1K_{100} oder mit einem gleichen Volumen 2 M LiCl in TM_1K_{100}

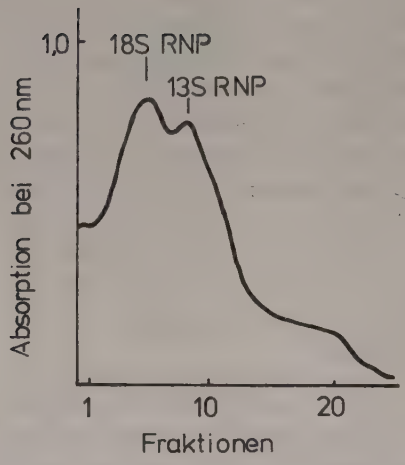


Abbildung 5:

Analytische Trennung der 13S und 18S RNPs in 5-20%igem Saccharosegradienten (Gewicht pro Volumen).

versetzt und hochtourig zentrifugiert. Eine dritte Probe wurde nicht mit LiCl behandelt, sondern durch Gelfiltration über eine Agarose Säule (A-0,5 m; 3,5 x 100 cm) von Resten löslicher RNase A getrennt. Die eluierten Untereinheiten wurden mit einem gleichen Volumen Äthanol 20 Minuten bei -20°C präzipitiert und dann zentrifugiert. Das Sediment und die mit LiCl behandelten Proben wurden in 30mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$ und 5 mM KCl gelöst und eingefroren (-80°C).

40-50 mg der hydrolysierten Untereinheiten wurden zur Trennung ihrer Spaltprodukte im Zonalrotor (B XV, Beckman) in einem 5-20%igen Saccharosegradienten, der 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA enthielt, zentrifugiert. Bei 30 000 UpM und 4°C dauerte der Lauf 18 Stunden. Nach der Trennung wurden die Fragmente durch Vermessen bei 280 nm lokalisiert.

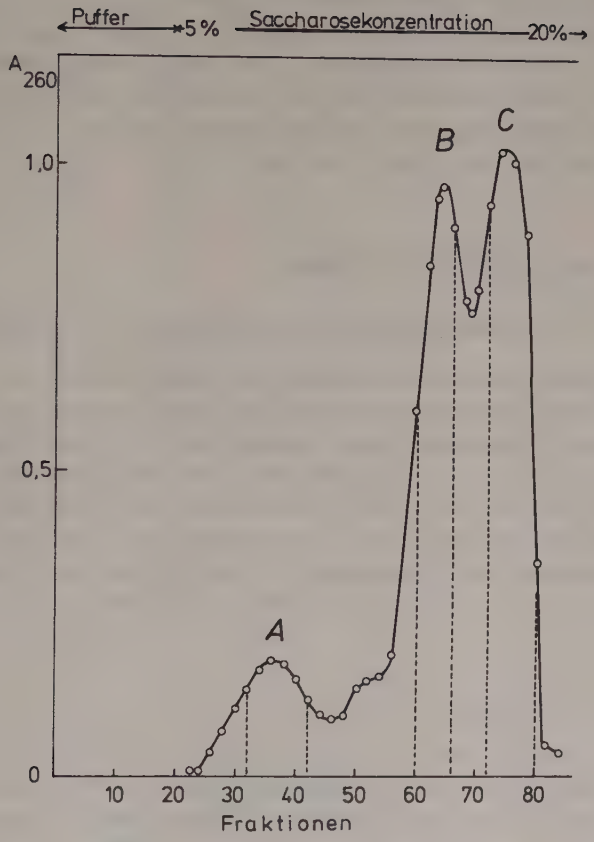


Abbildung 6: Präparative Trennung der 13S und 18S RNPs in einem Beckman Zonalrotor (B XV Ti). Gipfel A = 5S RNS-Protein Komplexe und verschiedene Fragmentkomplexe der 23S RNS. Gipfel B = 13S RNP. Gipfel C = 18S RNP.

Die drei Hauptgipfel A, B und C (Abbildung 6) wurden gesammelt und die in ihnen enthaltenen Fragmente durch Ultrafiltration in einer Amicon-Kammer (Modell 202) bei einem Druck von 3 kp/cm^2 eingeengt, wobei für die Fragmente in A eine PM10 und für die Fragmente in B und C eine PM30 Membran (Amicon) Verwendung fanden. Die Saccharose wurde durch wiederholtes Einengen und Verdünnen der Proben mit 0.1 mM EDTA und 0.1 mM NaCl aus der Lösung entfernt.

D.2.6 Der 5S RNS-Protein Komplex

D.2.6.1 Säulenchromatographische Reinigung des Komplexes

Zur weiteren Reinigung der RNPs in Gipfel A (Abb.6) wurden 20 mg des Fragmentgemisches aus mehreren Zonalläufen (D.2.5.4) vereinigt und durch Ultrafiltration auf 7 ml eingeengt (D.2.5.4). Sie wurden auf eine Sephadex G100 Säule (4,5 x 200 cm) aufgetragen, die in 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA äquilibriert war. Es wurden Fraktionen von je 7.0 ml gesammelt. Zwischen den Fraktionen 105 und 135 eluierten zwei Gipfel, AI und AII (Abb.7), deren Fraktionen vereinigt wurden.

D.2.6.2 Alkoholfällung

Die Komplexe in den Gipfeln AI und AII wurden durch Fällung mit Äthanol konzentriert. Zunächst wurden 1/100 Volumen 1 M $MgCl_2$ und 1/10 Volumen 1 M KCl zu den Proben hinzupipettiert. Dann wurden sie mit dem gleichen Volumen Äthanol gemischt und 24 Stunden bei -20°C ausgefällt.

D.2.6.3 Identifizierung der RNS

Nach der Phenolextraktion (D.2.3) wurde die RNS aus den RNPs in Gipfel AI (Abb.6) in 4%igen Polyacrylamid-Gelplatten (0,5 x 20,0 x 20,0 cm) analysiert (D.1.4). Der Elektrophoresepuffer

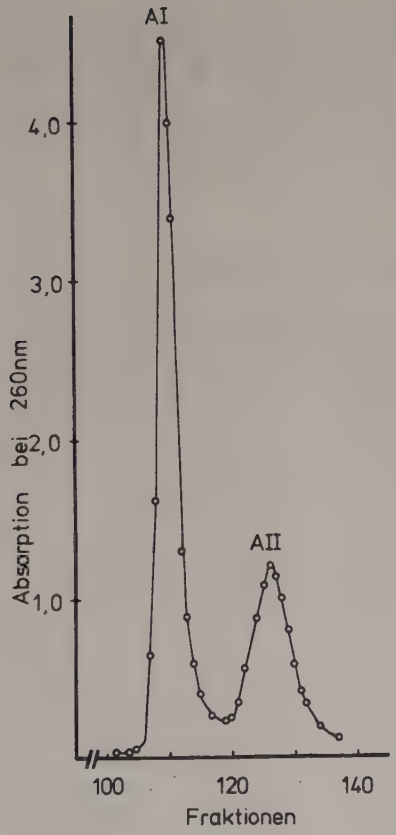


Abbildung 7: Säulenchromatographische Trennung des 5S RNS-Protein Komplexes (AII) von Fragmentkomplexen der 23S RNS (AI) über eine Sephadex G100 Säule.

enthielt 0.089 M Tris-Borat, pH 8.5. Die Elektrophorese dauerte 8 Stunden bei 4°C und 200 Volt. Nach Beendigung des Laufs wurde die Gelplatte mit Pyronin G (D.1.5) gefärbt.

Die RNS aus den RNPs in Gipfel AII war kleiner und wanderte entsprechend in höherprozentige Gele. 0.01 mg der Probe und 0.01 mg 5S RNS (als Kontrolle) wurden auf ein 12,5%iges Gel (D.1.4) aufgetragen und 20 Stunden bei 200 Volt und 4°C in Tris-Borat Elektrophoresepuffer (D.1.3) getrennt. Die Gelplatte wurde mit Pyronin G gefärbt (D.1.5).

D.2.6.4 Identifizierung der Proteine

Zur Identifizierung der Proteine im nativen 5S RNS-Protein Komplex (Gipfel AII, Abb.7) wurde 1 mg des Komplexes mit Ribonukleasen verdaut (D.2.2.2) und in der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a). Als Referenz wurden auf eine zweite Platte 1,8 mg der Proteine der 50S Untereinheit aufgetragen.

D.2.6.5 Bindung von L5, L18 und L25 an die RNS

Zum Beweis, daß der in Gipfel AII isolierte Komplex tatsächlich 5S RNS enthielt, wurden diejenigen Proteine, die allein spezifisch an die 5S RNS binden (Horne und Erdmann, 1972; Gray et al., 1972) mit der RNS aus Gipfel AII unter Rekonstitutionsbedingungen (Nomura und Erdmann, 1970) inkubiert.

In einem kleinen Ansatz (Gesamtvolumen = 40 µl) wurden 0.01 mg der RNS mit einem vierfach molaren Überschuß an L5, L18 oder L25 sowie L1 (als Kontrolle) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM $MgCl_2$ und 0.2 M KCl bei 35°C 45 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben direkt auf 8%ige Disk-Gele (D.1.4) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM $MgCl_2$ und 0.15 M KCl. Sie dauerte 8 Stunden bei 8 mA pro Gel

(4°C). Nach Beendigung des Laufs wurden die Protein-RNS Komplexe 3 Stunden mit Coomassie Brilliant Blau (D.1.5) gefärbt.

D.2.6.6 Untersuchungen zur Stöchiometrie der Proteine im 5S RNS-Protein Komplex

(a) Elektrophoretische Trennung von drei Komplexen:

Nach der Alkoholfällung (D.2.6.2) wurde der native 5S RNS-Protein Komplex (Gipfel AII, Abb.7) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM $MgCl_2$ und 0.3 mM NH_4Cl gelöst und vier Stunden gegen denselben Puffer dialysiert. 0.02 mg und 0.06 mg der Probe wurden jeweils auf ein 6,5%iges Disk-Gel (D.1.4) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Probenpuffer durchgeführt, wobei der Puffer ständig mit Hilfe einer Kreiselpumpe zwischen Kathoden- und Anodenreservoir ausgetauscht wurde. Der Lauf dauerte 6 Stunden (4 mA pro Röhrchen, 4°C).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel, auf das 0.2 mg des 5S RNS-Protein Komplexes aufgetragen worden waren, mit Coomassie Brilliant Blau (D.1.5) gefärbt. Dann wurde es neben das ungefärbte Gel gelegt, so daß aus diesem die Stücke mit den Protein-RNS Komplexen ausgeschnitten werden konnten.

(b) SDS-Gelelektrophorese:

Zur Dissoziation der Proteine von der 5S RNS wurden die Komplexe mit SDS behandelt. Dazu wurden die Gelstückchen (D.2.6.6a) auf 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (D.1.4) (Weber und Osborn, 1969) gelegt, die vorher an der Oberfläche mit SDS-Elektrophoresepuffer (D.1.3) benetzt worden waren. Die Gelstückchen wurden anschließend mit einem Tropfen SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet, und die Glasröhrchen wurden, um ein Austrocknen der Gele zu verhindern, mit Parafilm verschlossen. Die Proben wurden so über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurden die dissoziierten Proteine

elektrophoretisch getrennt (8 mA pro Gel, 8 Stunden bei Zimmertemperatur) und mit Coomassie Brilliant Blau (D.1.5) acht Stunden gefärbt.

Nach dem Entfärben der Gele in 5%iger Essigsäure konnten die Proteinbanden mit einem Joyce-Loebl Mikrodensitometer vermessen werden. Die Intensitäten der Banden wurden als Flächen unter einer Kurve wiedergegeben und konnten mit einem Haff-Planimeter in Noniuseinheiten ausgemessen werden. Die Proteinmengen in den Gelen konnten so miteinander verglichen werden, wobei berücksichtigt werden mußte, daß gleiche Mengen der Proteine L5, L18 und L25 von Coomassie Brilliant Blau unterschiedlich intensiv gefärbt werden (s. Eichgeraden Abb.8).

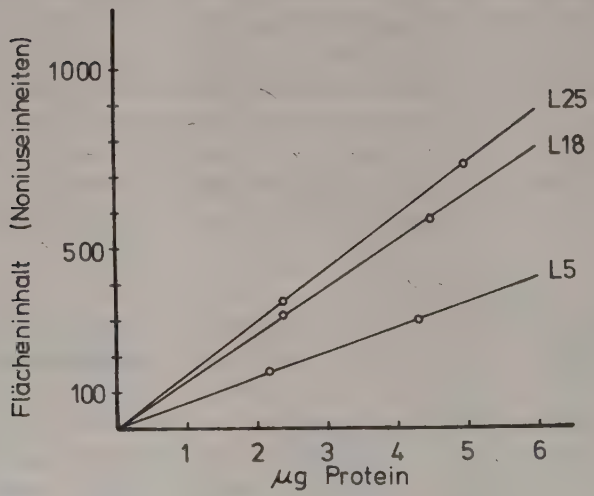


Abbildung 8: Eichgeraden, die die unterschiedliche Färbung gleicher Mengen der Proteine L5, L18 und L25 mit Coomassie Brilliant Blau angeben. Die Proteinmengen wurden mit dem Folin-Ciocalteu Phenol Reagenz bestimmt (Lowry et al., 1951).

D.2.7 Die 13S und die 18S RNPs

D.2.7.1 Identifizierung der Proteine in den 13S und 18S RNPs

4,8 mg des 13S RNPs und 5,6 mg des 18S RNPs wurden mit einer Mischung aus RNase A und RNase T_1 (D.2.2.2) verdaut. Ihr Proteingehalt wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a) analysiert.

D.2.7.2 Nachweis für den unspezifischen Austausch von Proteinen

Vor einiger Zeit war über den unspezifischen Austausch von Proteinen zwischen 30S und 50S Partikeln beim Aufenthalt in EDTA-Puffer berichtet worden (Newton et al., 1975). Um zu prüfen, ob auch ein unspezifischer Austausch von Proteinen während der Präparation der 13S und 18S RNPs im Saccharosegradienten (D.2.5.4) erfolgte, wurden 13 µg des 13S RNPs mit einer gleichen Menge 16S RNS oder 23S RNS im Gradientenpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA) gemischt und 2 Stunden bei 0°C inkubiert. Danach wurden die RNS-Moleküle und die RNPs in 3%igen Disk-Gelen voneinander getrennt (3 mA pro Röhrchen) (D.1.4). Die Bindung der Proteine an die RNS wurde durch Färben mit Coomassie Brilliant Blau (D.1.5) nachgewiesen.

D.2.7.3 Dissoziation unspezifisch gebundener Proteine

In einem Versuch, unspezifisch gebundene Proteine von den 13S und 18S RNPs abzulösen, wurden die Ribonukleoprotein-Partikel mit verhältnismäßig hohen KCl-Konzentrationen in Gegenwart von 20 mM $MgCl_2$ behandelt.

11 mg des 13S RNPs und 14 mg des 18S RNPs wurden im Dialyseschlauch durch Einbetten in Ficoll 400 auf 5 ml eingeengt. Anschließend wurden sie 16 Stunden gegen 30 mM Tris-HCl, pH 7.4,

20 mM $MgCl_2$, 6 mM ß-Mercaptoäthanol sowie 0.8 M KCl oder 1.6 M KCl dialysiert und schließlich 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation, bei der die unspezifisch gebundenen Proteine von der RNS dissoziiert werden sollten, wurden die Proben auf Standard-Rekonstitutionsbedingungen (TMK Puffer, D.1.3) verdünnt (Nomura und Erdmann, 1970) und erneut 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch die zweite Inkubation sollten sich Proteine, die spezifisch einen Komplex mit der 13S oder der 18S RNS bilden, die aber durch die hohe Salzkonzentration abgelöst worden waren, wieder an die RNS anlagern. Die nicht gebundenen Proteine wurden durch Gelfiltration über eine Agarose Säule (A-0,5 m; 2 x 80 cm) von den Protein-RNS Komplexen getrennt.

Nachdem die Komplexe aus der Säule eluiert waren, wurden sie mit einem gleichen Volumen Äthanol ausgefällt. Ihre Proteine wurden durch RNase-Behandlung (D.2.2.2) extrahiert und in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a) identifiziert.

D.2.8 Charakterisierung der RNS-Fragmente

D.2.8.1 Der Einfluß von Mg^{2+} auf die Hydrolyse

Bei der Hydrolyse der 50S Untereinheiten hatte sich gezeigt, daß die Ausbeute an 13S und 18S RNPs sehr unempfindlich gegenüber Veränderungen im Enzym-Substratverhältnis war (E.4.1). Da die Stabilität von RNS-Molekülen dagegen sehr empfindlich auf Veränderungen im Ionenmilieu, insbesondere bivalente Ionen, reagiert, wurde geprüft, inwieweit die Isolierung intakter 13S und 18S RNS-Moleküle von der Mg^{2+}-Konzentration im Hydrolysepuffer abhing.

In sechs Versuchsansätzen wurden 50S Untereinheiten im Enzym-Substratverhältnis 1 : 3000 unter Standardbedingungen (D.2.5.1) bei 0.01, 0.1, 0.4, 0.7, 1.0 und 2.0 mM $MgCl_2$ hydroly-

siert. Nachdem die trägergebundene RNase A abzentrifugiert war, wurden die hydrolysierten 50S Partikel sofort drei Phenolextraktionen (D.2.3) (Spierer et al., 1975) unterworfen. Das Phenol war mit TM_1K_{100} (Hydrolysepuffer, D.1.3) gesättigt.

Je 0.03 mg des Fragmentgemisches wurden in 3%igen Disk-Gelen (D.1.4) in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, analysiert. Die RNS wurde mit Pyronin G (D.1.5) sichtbar gemacht.

D.2.8.2 Hydrolyse von ^{32}P-markierten 50S Partikeln

Ehe Rekonstitutionsversuche mit den Fragmenten der 23S RNS und ribosomalen Proteinen durchgeführt wurden, sollte nachgewiesen werden, daß die 13S und 18S RNS-Fragmente mit denen von Allet und Spahr (1970) sowie Spierer et al. (1975) identisch waren. Dazu war es notwendig, die Fragmente radioaktiv (Phosphor-32) zu isolieren und "Fingerprint"-Analysen durchzuführen (Sanger et al., 1965). Außerdem sollte mit Hilfe des Oligonukleotidmusters festgestellt werden, ob das kleinere Fragment, das stets neben der 13S und der 18S RNS bei der Präparation auftrat (D.2.9.3), ein Subfragment der 13S oder der 18S RNS war. Auf Grund seiner Größe wurde das kleinere Fragment 11S RNS genannt (ca. 1100 Nukleotide; E.4.2).

0.625 mg ^{32}P-markierte Untereinheiten wurden mit 0.8 µg trägergebundener RNase A in 1 ml TM_1K_{100} verdaut (D.2.5.1) und nach der Hydrolyse sofort mit Phenol extrahiert (D.2.8.2). Dann wurde die RNS mit 2,5 Volumen Äthanol aus der Pufferlösung ausgefällt (24 Stunden, -20°C).

D.2.8.3 Trennung der Fragmente in Polyacrylamid-Gelplatten

Die Trennung der ^{32}P-markierten Fragmente erfolgte elektrophoretisch in 3%igen Polyacrylamid-Gelplatten (0,5 x 20 x 20 cm) (D.1.4). Der Puffer enthielt 0.089 M Tris-Borat, pH 8.5. Er

wurde während des Laufs ständig auf 4°C gekühlt und mit Hilfe einer Kreiselpumpe zwischen Kathoden- und Anodenraum umgeschichtet. Die Elektrophorese dauerte 15 Stunden bei 200 Volt.

Nach dem Lauf wurde die obere Glasplatte vorsichtig vom Gel abgehoben und dieses stattdessen mit Parafilm abgedeckt. Darauf wurde ein Röntgenfilm gelegt und je nach der Radioaktivität der Probe 30 Minuten bis mehrere Stunden belichtet. Der Film wurde drei Minuten entwickelt und 15 Minuten im Fixierbad fixiert. Die Fragmente waren dann deutlich auf dem Autoradiogramm sichtbar.

D.2.8.4 Elektrophoretische Extraktion der Fragmente aus dem Gel

Die Extraktion der ^{32}P-markierten RNS-Fragmente aus niederprozentigen Polyacrylamidgelen (3%ig) für die "Fingerprint"-Analyse erwies sich als besonders problematisch, da bei der üblichen Extraktionsmethode durch Rühren der Gele in Phenol und Puffer stets geringe Mengen Acrylamid in die Probe gerieten, die auch durch Ultrafiltration (Millipore Filter) und wiederholte Alkoholfällung nicht entfernt werden konnten. Dieses Acrylamid störte bei der "Fingerprint"-Analyse. Es war daher notwendig, die Fragmente elektrophoretisch aus dem Gel zu eluieren.

Für die elektrophoretische Extraktion der Fragmente wurde eine Disk-Elektrophorese-Kammer benötigt. In diese wurden Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 9 mm eingesetzt. Unten wurden sie mit DEAE-Papier und Dialyseschlauch verschlossen. Von oben wurden die Gelstücke eingefüllt (Abb.9) und mit Tris-Borat Elektrophoresepuffer (D.1.3) überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in demselben Puffer. Wegen der Größe der RNS-Fragmente (1800, 1300 und 1100 Nukleotide) dauerte der Lauf 15 Stunden bei 8 mA pro Röhrchen (4°C). Nach Beendigung der Elektrophorese befanden sich 90-95 % der Radioaktivität auf dem DEAE-Papier.

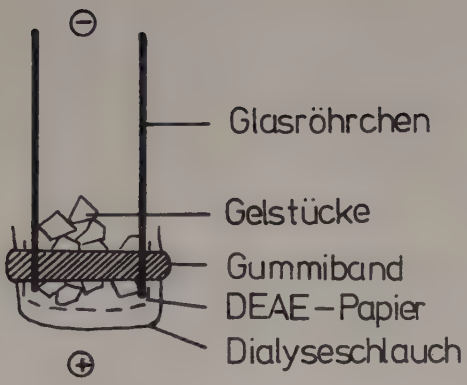


Abbildung 9: Elektrophoretische Elution von RNS-Fragmenten aus Polyacrylamid-Gelstücken auf DEAE-Papier

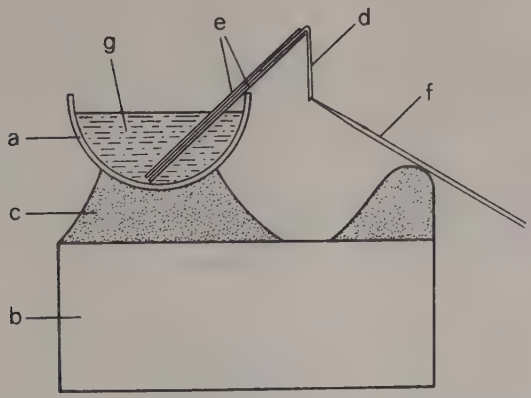


Abbildung 10: Querschnitt durch eine Vorrichtung, mit der RNS-Fragmente aus dem DEAE-Papier eluiert werden.

a = Glastrog
b = Holzblock
c = Plastillin
d = DEAE-Papier
e = Objektträger
f = Kapillare
g = 30%iges Triäthylamincarbonat, pH 10

(Aus Barrell, 1971)

Im nächsten Schritt wurde die RNS von dem DEAE-Papier eluiert. Dazu wurden die Papierstückchen als erstes dreimal 10 Minuten lang in bidestiliiertes Wasser getaucht, um $Tris^+$- und BO_3^{3-}-Ionen abzulösen. Dann wurden sie einmal kurz mit 95%igem Äthanol behandelt und bei Zimmertemperatur getrocknet. Danach wurden die Fragmente mit 200/ul 30%igem Triäthylamincarbonat, pH 10, vom DEAE-Papier mit Hilfe einer ausgezogenen Kapillare eluiert. Die Technik ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt (Barrell, 1971).

Zur Vorbereitung der RNS für die "Fingerprint"-Analyse wurde das Triäthylamincarbonat unter leichtem Vakuum an der Wasserstrahlpumpe evaporiert. Die getrocknete RNS wurde in 250/ul 0,24 M NaAc, pH 5.0, aufgenommen und mit 2,5 Volumen Äthanol 4 Stunden bei -20°C ausgefällt. Falls bis dahin noch Spuren des Elektrophoresepuffers in der Probe waren, so verblieben sie bei der Alkoholfällung im Überstand. Die gefällte RNS wurde in 50/ul $H_2O_{bidest.}$ gelöst und lyophilisiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, so daß die Probe auch frei von NH_4^+- und Ac^--Ionen war.

D.2.8.5 Kombinierte Hydrolyse der Fragmente mit RNase T_1 und alkalischer Phosphatase

RNase T_1 (Takadiastase T_1 Ribonuklease) spaltet innerhalb der Nukleotidsequenz spezifisch hinter allen Guaninnukleotiden: HO-Np-Np-Gp↓Np. Dadurch werden große RNS-Moleküle in definierte Bruchstücke (Oligonukleotide) zerlegt, die charakteristisch für jede RNS-Art sind.

Alkalische Phosphatase spaltet den letzten Phosphatrest vom 3'-Ende der Oligonukleotide ab: HO-Np-Np-↓Np. Der Einsatz von alkalischer Phosphatase neben RNase T_1 hat sich als vorteilhaft für die Trennung verhältnismäßig großer Oligonukleotide auf Zelluloseacetat und DEAE-Papier (Fingerprinting) erwiesen.

Zur enzymatischen Hydrolyse wurden die RNS-Fragmente, die von

einem Versuchsansatz (D.2.8.2) isoliert worden waren, jeweils in 6 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA-Puffer, der außerdem 0.1 mg/ml Ribonuklease T_1 und 0.5 mg/ml alkalische Phosphatase enthielt, aufgenommen. Die Proben wurden in Schmelzpunktröhrchen aufgesogen und 1 Stunde bei 37°C im Trockenschrank hydrolysiert (Barrell, 1971; Brownlee, 1972).

D.2.8.6 "Fingerprint"-Analyse

Die Trennung der Oligonukleotide wurde nach der von Sanger et al. (1965) entwickelten Methode durchgeführt. Sie ist ausführlich von Barrell (1971) und Brownlee (1972) beschrieben worden:

In der ersten Dimension werden die Oligonukleotide auf Zelluloseazetat-Streifen (3 x 60 cm) in 7 M Harnstoff, 5 mM Na-EDTA und 5%iger Essigsäure bei pH 3.5 getrennt. Bei diesem pH-Wert ist der Ladungsunterschied zwischen den Basen der Oligonukleotide am größten, dementsprechend wandern Oligonukleotide mit einem hohen Anteil an Uracil am weitesten zur Anode. Die Elektrophorese dauert 2 Stunden bei 3 KV. Danach wird der Zelluloseazetat-Streifen auf einen Bogen DEAE-Papier (42 x 80 cm) gelegt. Darüber werden 4 Schichten feuchtes Whatmann 3MM Papier gelegt und mit einer Plexiglasplatte fest angedrückt. Dabei eluiert das H_2O die Oligonukleotide vom Zelluloseazetat auf das DEAE-Papier. Da gleichzeitig Harnstoff, Varsol (Kühlmittel) und Essigsäure auf das DEAE-Papier gelangen, muß das DEAE-Papier sorgfältig mit 300-500 ml 70%igem Äthanol abgespritzt werden. Nach dem Trocknen wird das DEAE-Papier mit 7%iger Ameisensäure besprüht und in den Elektrophoresetank eingesetzt.

Bei der Elektrophorese in der zweiten Dimension überlagern sich zwei Effekte: Ionenaustauschchromatographie am DEAE-Papier und elektrophoretische Trennung der Oligonukleotide zwischen den beiden Polen des elektrischen Feldes. Mit dieser

Technik wird eine bessere Trennung erzielt als mit einer einfachen Ionenaustauschchromatographie am DEAE-Papier.

In meinen Versuchen dauerte die Elektrophorese in der zweiten Dimension länger als üblich (11 Stunden bei 200 mA), da wegen der Größe der zu analysierenden Fragmente (1800, 1300 und 1100 Nukleotide) sehr viele ähnliche Oligonukleotide bei der T_1-Spaltung entstanden waren, die sich nur durch eine ausgedehnte Elektrophorese trennen ließen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das DEAE-Papier 24 Stunden im Luftstrom unter dem Abzug getrocknet. Dann wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und 1-3 Wochen belichtet.

D.2.8.7 Nachspaltung der Oligonukleotide

Nach dem Entwickeln der Autoradiogramme (D.2.8.3) konnten die Oligonukleotide auf dem DEAE-Papier lokalisiert werden. Einige wurden ausgeschnitten und mit 100 µl 30%igem Triäthylamincarbonat, pH 10, eluiert (D.2.8.4). Die Proben wurden unter leichtem Vakuum getrocknet, in 50 µl $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen und lyophilisiert. Sie wurden noch zweimal in 20 µl $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen und lyophilisiert. Dann wurden sie in 8 µl Enzymlösung (RNase A : 0.1 mg/ml, tRNS : 1 mg/ml, Trägersubstanz), 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA aufgenommen und anschließend 30 Minuten bei 37°C hydrolysiert (Barrell, 1971; Brownlee, 1972).

Nach der Hydrolyse wurden die Spaltprodukte sofort auf ein Blatt DEAE-Papier (44 x 60 cm) aufgetragen und in 0,5%igem Pyridin und 5%iger Essigsäure elektrophoretisch getrennt. Bei 150 mA dauerte der Lauf 2 1/2 Stunden. Nach dem Belichten und Entwickeln des Röntgenfilms wurden die Mono- und Oligonukleotide auf Grund ihres R_f-Wertes gegenüber dem Farbstoff Xylen Cyanol (blau) identifiziert.

D.2.9 Präparative Isolierung der 13S, 18S und 11S RNS

D.2.9.1 Hydrolyse der Untereinheiten

Zur Isolierung der 13S und 18S RNS im präparativen Maßstab wurden 45 mg 50S Partikel wie unter D.2.5.1 bei einem Enzym : 23S RNS Verhältnis von 1 : 3000 (Gewicht/Gewicht) in TM_1K_{100} (D.1.3) verdaut. Nach Beendigung der Hydrolyse durch Abzentrifugieren der trägergebundenen RNase A wurde sofort dreimal mit Phenol extrahiert (D.2.8.1). Danach wurde die RNS mit 2 Volumen Äthanol bei -20°C ausgefällt.

D.2.9.2 Zonalzentrifugation

Die RNS-Fragmente von einer Hydrolyse (ca. 30 mg nach der Alkoholfällung) (D.2.9.1) wurden in 40 ml sterilem Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$ und 5 mM KCl) gelöst und in einem 5-20%igem Saccharosegradienten in einem Zonalrotor B XV Ti getrennt. Die Bedingungen waren dieselben wie bei der Trennung der 13S und 18S RNPs (D.2.5.4). Nach der Trennung wurden die Proben mit 1/100 Volumen 1 M $MgCl_2$ und 1/10 1 M KCl versetzt und 24 Stunden bei -20°C präzipitiert. Abbildung 11 zeigt die Trennung der RNS-Fragmente.

D.2.9.3 Präparative Gelelektrophorese

Eine qualitative Analyse der RNS in dem Gipfeln A und B (Abb.11) mit Hilfe der Gelelektrophorese (Abb.27a) hatte ergeben, daß in dem Gipfel der 13S RNS noch ein zweites großes Fragment sedimentierte. Da dieses auf Grund seiner ähnlichen Größe im Saccharosegradienten nicht von der 13S RNS getrennt werden konnte, wurde gereinigte 13S RNS und das kleinere Fragment (11S RNS) in einer präparativen Gelelektrophorese isoliert.

Die elektrophoretische Trennung der 13S und 11S RNS erfolgte

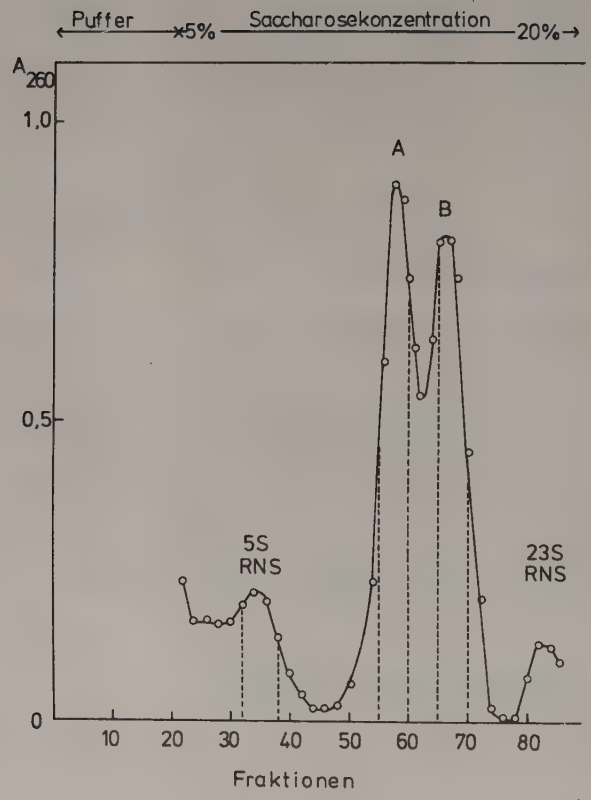


Abbildung 11: Zonalzentrifugation großer RNS-Fragmente in einem 5-20%igen Saccharosegradienten.
Gipfel A = 11S RNS plus 13S RNS.
Gipfel B = 18S RNS.

in 4%igen Polyacrylamid-Gelplatten (0,5 x 20 x 20 cm) (D.1.4), in die drei große Taschen zur Aufnahme der Proben einpolymerisiert waren. In jede wurden 0,22 mg des Fragmentgemisches eingefüllt. Das Auftragsvolumen betrug 100 µl. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0.089 M Tris-Borat, pH 8.5. Er wurde während der Elektrophorese ständig zwischen Kathoden- und Anodenraum ausgetauscht. Der Lauf dauerte 15 Stunden (200 Volt, 4°C).

Die RNS-Banden wurden im Gel lokalisiert, indem unterhalb der Taschen an den Seiten Gelstreifen ausgeschnitten und mit Toluidin-Blau Färbelösung (D.1.5) 20 Minuten gefärbt wurden. Nach dem Entfärben in 5%iger Essigsäure (30 Minuten) wurden die gefärbten Gelstreifen neben die ungefärbten gelegt, so daß aus diesen die Gelstücke mit der 13S und 11S RNS ausgeschnitten werden konnten.

Als nächstes wurden die Gelstücke homogenisiert, indem sie zweimal durch eine Spritze gepreßt wurden. Dann wurden 4 ml sterilen Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, und 90 mM NaCl) hinzugefügt, und das Ganze wurde 24 Stunden bei 4°C kräftig gerührt. Schließlich wurden 4 ml Phenol hinzugefügt und zusammen mit der Probe weitere 12 Stunden gerührt. Zur Trennung der RNS vom Phenol und vom Acrylamid wurde die Probe 30 Minuten bei 2300 UpM in einem Ausschwingrotor (Christ Zentrifuge) zentrifugiert. Im Überstand befand sich die wäßrige Phase mit der RNS, in der mittleren Schicht folgte das Polyacrylamid und ganz unten befand sich das Phenol. Die Pufferlösung wurde vorsichtig abpipettiert. Das Phenol und das Polyacrylamid wurden noch einmal mit 2 ml Puffer extrahiert. Die Überstände von beiden Extraktionen wurden vereinigt und durch Nitrozellulosefilter (Millipore) filtriert, wobei restliche Acrylamidstückchen auf dem Filter zurückgehalten wurden. Spuren von Phenol wurden durch zweimaliges Extrahieren mit 1/2 Volumen Diäthyläther entfernt. Schließlich wurde die RNS mit einem doppelten Volumen Äthanol (24 Stunden, -20°C) ausgefällt.

D.2.10 Bindung von Proteinen an die 11S, 13S und 18S RNS

Zur Bestimmung, welche Proteine der 50S Untereinheit ihren Bindungsort auf der 13S, 18S oder 11S RNS haben (primäre Bindungsproteine), und welche Proteine zusammen mit den primären Bindungsproteinen an diese RNS-Fragmente binden können (sekundäre Bindungsproteine), wurden Rekonstitutionsexperimente zwischen den RNS-Fragmenten und den Proteinen der 50S Untereinheit durchgeführt. Die Experimente wurden unter den Ionenbedingungen durchgeführt, unter denen aktive 50S Untereinheiten von Bacillus stearothermophilus rekonstituiert werden können (Nomura und Erdmann, 1970).

Für die Rekonstitutionsexperimente standen ausreichende Mengen der 13S RNS und der 18S RNS zur Verfügung, da diese Fragmente durch Zonalzentrifugation isoliert werden konnten. Das 11S Fragment mußte dagegen präparativ aus Polyacrylamid-Gelen isoliert werden. Deshalb war nur sehr wenig Material für die Versuche vorhanden. Die Rekonstitutionsexperimente der 11S RNS und äquimolarer Mengen der 13S und 18S RNS wurden darum in sehr kleinem Maßstab mit tritiierten Proteinen durchgeführt. Der Einsatz radioaktiver Proteine erwies sich darüber hinaus als vorteilhaft, weil auf diese Weise die Affinität der Proteine zu den drei RNS-Fragmenten quantitativ erfaßt werden konnte.

D.2.10.1 Totale Rekonstitution

In 500 µl TMK-Puffer wurden je 0.124 mg 18S RNS, 0.1 mg 13S RNS und 0.075 mg 11S RNS mit einem zweifach molaren Überschuß an tritiierten Proteinen der 50S Untereinheit (TP 50) und einem zweifach molaren Überschuß an 5S RNS 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Probe über eine Agarose-Säule (A-0,5 m; 1 x 30 cm) in TMK-Puffer (D.1.3) filtriert, wodurch nichtbindende Proteine von den Protein-RNS Komplexen getrennt wurden. Abbildung 12 zeigt die typische Trennung der 23S RNS

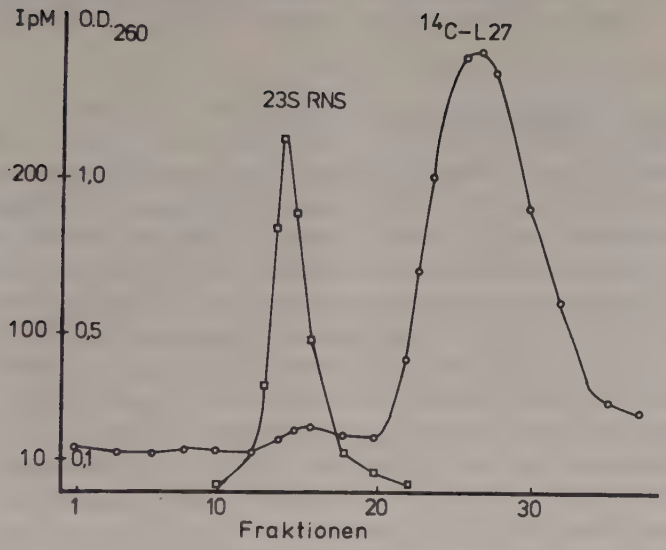


Abbildung 12: Trennung der 23S RNS vom Protein L27 über eine Agarose Säule (A-0,5 m; 1 x 30 cm).

von einem nicht-bindenden Protein (L27).

Nach der Isolierung des Komplexes wurden jeweils 5 mg 50S Untereinheiten zur Probe hinzugefügt und 24 Stunden gegen 0.1 mM EDTA und 0.1 mM NaCl bei mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Dann wurden die Proteine mit RNase A und RNase T_1 extrahiert (D.2.2.2). Anschließend wurden sie in der zweidimensionalen Gelelektrophorese getrennt (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a).

Die Bestimmung der Radioaktivität der Proteine nach ihrer Trennung im zweidimensionalen Gel wurde ähnlich wie unter D.2.4.2 durchgeführt. Das Programm des Proben-Oxidizers wurde auf Tritium eingestellt. Als Lösungs- und Szintillationsmittel für den entstehenden tritiierten Wasserdampf dienten 15 ml Monophase^{TM}40 für jede Probe.

D.2.10.2 Bindung von Einzelproteinen

Zur Bestätigung einiger Rekonstitutionsergebnisse wurden diejenigen Proteine, die allein spezifisch an die 23S RNS binden (Garrett et al., 1974) geprüft, ob sie an die 11S, 13S oder 18S RNS binden. Dazu wurden 0.2 mg der 18S RNS und 0.2 mg der 13S RNS, die zu 20 % mit der 11S RNS kontaminiert war, mit einem fünffach molaren Überschuß der Proteine L1, L2, L3, L4, L6, L13, L16, L20, L23 oder L24 für 30 Minuten bei 37°C in 1 ml TMK Puffer inkubiert (Garrett et al., 1971). Die Proben wurden anschließend über eine Agarose-Säule (A-0.5 m; 1 x 30 cm) wie unter D.2.10.1 filtriert. Nach der Elution wurden die Komplexe 24 Stunden mit 1,5 Volumen Äthanol ausgefällt. Nachdem sie abzentrifugiert waren, wurden sie in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM $MgCl_2$ aufgenommen und unter gleichen Pufferbedingungen in 3%igen Disk-Gelen (D.1.4) analysiert. Die Protein-RNS Komplexe wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (D.1.5).

E. Ergebnisse

E.1 Zugänglichkeit der Proteine im 50S Partikel gegenüber Formaldehyd

Die 50S Untereinheiten der E. coli Ribosomen wurden nach der Methode von Means und Feeney (1968) an den Aminogruppen der Proteine reduktiv methyliert. Durch die Verwendung radioaktiven Formaldehyds konnte das Ausmaß der Methylierung in jedem Protein erfaßt werden (D.2.4). Bei der Bewertung der Reaktivität der Proteine gegenüber Formaldehyd wurden die Anzahl der Lysinreste und die freien N-terminalen Aminogruppen der Proteine berücksichtigt. Die Werte für die Proteine L5, L7/L12, L10, L16, L18, L25, L26, L27, L29, L30, L32, L33 und L34 wurden Veröffentlichungen entnommen, die in Abschnitt B.1.3.4 zusammengefaßt sind. Die Anzahl der Lysinreste derjenigen Proteine, die noch nicht sequenziert worden sind, wurden mit Hilfe der Bruttoanalysen (Mora et al., 1971) und der Molekulargewichte (Dzionara et al., 1970) dieser Proteine berechnet.

Aus den Sequenzdaten geht hervor, daß die Werte für die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine, die mit der analytischen Ultrazentrifuge und nach der SDS-Methode (Weber und Osborn, 1969) bestimmt worden sind, zu hoch liegen. Die Abweichung der mit SDS bestimmten Molekulargewichte ribosomaler Proteine von ihrer tatsächlichen Größe ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt worden. Aus dem Verlauf der Kurve konnten näherungsweise die tatsächlichen Molekulargewichte bisher noch nicht sequenzierter Proteine entnommen werden. Die Werte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt worden.

Da Proteine mit einem hohen Lysinanteil stärker methyliert werden können als andere mit wenigen Lysinresten, wurde die Radioaktivität aller Proteine (= Impulse pro Minute und Protein) durch die Anzahl freier Aminogruppen dividiert (Anzahl

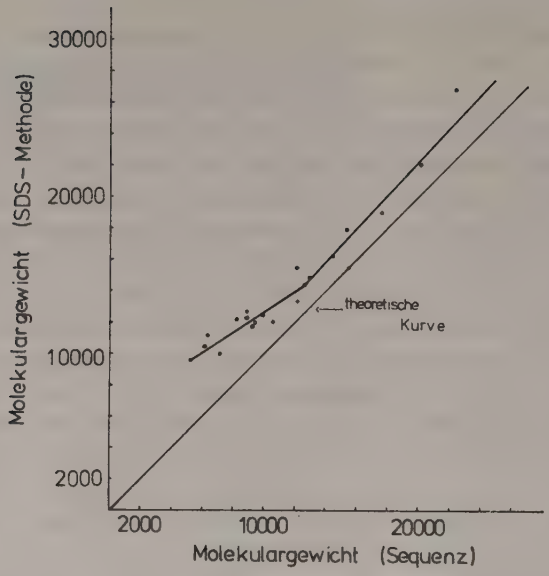


Abbildung 13: Die Abweichung der tatsächlichen Molekulargewichte ribosomaler Proteine von Werten, die mit der SDS-Gelmethode (Dzionara et al., 1970) bestimmt wurden. Eingetragen wurden die Molekulargewichte der Proteine S4, S6, S8, S9, S13, S15, S16, S18, S20/L26, S21, L5, L7/L12, L10, L16, L18, L25, L27, L29, L30, L32, L33 und L34. Die Werte entstammen den in Abschnitt B.1.3.4 zusammengefaßten Veröffentlichungen sowie persönlichen Mitteilungen von Dr. B. Wittmann-Liebold.

Tabelle 1: Molekulargewichte von Proteinen der 50S Untereinheit, deren Primärstrukturen bisher noch nicht aufgeklärt wurden.

Protein	Molekulargewicht[a]	Molekulargewicht[b]	Molekulargewicht[c]
L1	27600	26700	24000
L2	32400	31500	28500
L3	25800	27000	24200
L4	26200	25800	23200
L6	21200	22200	20000
L8	17700	17300	15300
L9	16900	17300	15300
L11	15300	19600	17400
L13	17700	17800	15800
L14	13800	16200	14500
L15	16500	17500	15500
L17	14000	16700	14800
L19	12800	14900	13000
L20	16700	17200	15200
L21	11800	13900	12000
L22	12600	14800	13000
L23	11200	12700	10300
L24	12000	14300	12500
L28	9500	12300	9700

(a) Molekulargewichte nach Zimmermann und Stöffler (1976)

(b) Molekulargewichte nach Dzionara et al. (1970)

(c) korrigierte Molekulargewichte (vgl. Kurve in Abb.13)

freier Aminogruppen = 1 N-Terminus + n Lysinreste). Für die Proteine L16 und L33 wurden je 1/2 Aminogruppe für den N-Terminus gerechnet, da die N-terminalen Aminosäuren dieser Proteine bereits monomethyliert im Protein vorliegen (Chen et al., 1976). L7 wurde auf Grund seiner Acetylierung als blokkiert angesehen (Terhorst et al., 1972). Für alle Proteine der 50S Untereinheit wurde angenommen, daß von ihnen je eine Kopie im Ribosom vorhanden ist. Nur für die Proteine L7/L12 gingen drei Kopien in die Berechnung ein (Hardy, 1975). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Aus Tabelle 2 kann entnommen werden, daß mit Ausnahme der Proteine L27, L28, L31 und L32 alle Proteine deutlich mit Formaldehyd reagiert hatten. Das Protein L34 war nicht analysiert worden, weil es unter Standardbedingungen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht nachzuweisen ist. Zwei Drittel der Proteine wiesen eine relativ geringe Reaktivität auf, während ein Drittel der Proteine stark bis sehr stark reagierte. Am stärksten wurden die Proteine L1, L7, L11 und L12 methyliert; es folgten die Proteine L4, L5, L6, L8 und/oder L9, L25, L29, L30 und L33.

Tabelle 2: Reaktivität der Proteine in den 50S Untereinheiten gegenüber Formaldehyd.

Impulse pro Minute und NH_2-Gruppe der Proteine

Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Gruppe IV	
L1	(43,7)	L5	(12,9)	L4	(11,5)	L2	(2,5)
L11	(26,2)	L8/9	(14,0)	L6	(12,4)	L3	(2,8)
L7/12	(53,7)	L25	(16,0)	L10	(7,3)	L13	(5,3)
		L29	(15,0)	L17	(8,5)	L14	(4,7)
				L18	(8,0)	L15	(4,2)
				L19	(8,2)	L16	(5,9)
				L26	(6,5)	L20	(2,9)
				L30	(10,0)	L21	(4,9)
				L33	(12,0)	L22	(5,3)
						L23	(2,9)
						L24	(3,0)
						L27	-
						L28	-
						L31	-
						L32	-

Die Proteine wurden nach dem Ausmaß ihrer Reaktion in vier Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: mehr als 25 IpM je Aminogruppe
Gruppe II: zwischen 12,5 und 25 IpM je Aminogruppe
Gruppe III: zwischen 6 und 12,5 IpM je Aminogruppe
Gruppe IV: weniger als 6 IpM je Aminogruppe.

E.2 Der native 5S RNS-Protein-Komplex

E.2.1 Identifizierung der Proteine und der RNS

Nach der enzymatischen Spaltung der 50S Untereinheiten mit trägergebundener RNase A (D.2.5.1) konnten die resultierenden Fragmente durch Dichtegradienten-Zentrifugation in drei Gipfel fraktioniert werden (D.2.4.4; Abb.6). Durch zusätzliche säulenchromatographische Reinigung gelang es (D.2.6.1), aus dem Fragmentgemisch in Gipfel A, die 5S RNS als Komplex mit den Proteinen L5, L18 und L25 weitgehend sauber zu isolieren (Abb. 7, Gipfel A II).
Abbildung 14 zeigt die RNS, nachdem sie aus dem Komplex extrahiert worden war, zusammen mit einer 5S RNS Kontrolle in einem 12%igen Gel (D.2.6.3). Die 5S RNS war geringfügig von kleineren RNS-Fragmenten kontaminiert. Die intensivste Nebenbande enthielt wahrscheinlich denaturierte 5S RNS.

Der Proteingehalt des 5S RNS-Protein Komplexes ist in Abbildung 15 wiedergegeben. In der zweidimensionalen Auftrennung sind deutlich die Proteine L5, L18 und L25 zu sehen. Sie sind nicht in stöchiometrisch gleichen Mengen vorhanden, weil L25 etwas stärker als L18, und dieses wiederum viel stärker als L5 von Amidoschwarz gefärbt wurde (Abb.15). Bei äquivalenten Mengen hätten alle drei Proteinflecke etwa gleich intensiv sein müssen. Daraus kann man ableiten, daß ein Teil der Proteine L5 und L18 während der Präparation von der 5S RNS dissoziierte, während das Protein L25 am festesten an der 5S RNS haftete.

Neben den Proteinen L5, L18 und L25, die direkt an die 5S RNS binden (s. Übersichtsartikel von Monier, 1974, und von Erdmann, 1976), waren auch die Proteine L1, L8/9, L13, L15, S9 und L22 im zweidimensionalen Gel zu sehen (Abb.15). Die Proteine L1 und L9 binden im gleichen Bereich wie die 5S RNS an die 23S RNS (Brimacombe und Sloof et al., unpublizierte Daten). Es ist darum möglich, daß beide Proteine in einem ein-

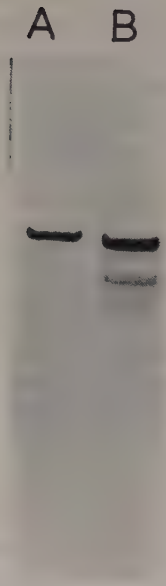
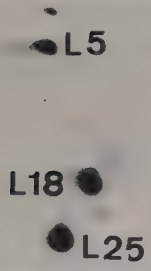


Abbildung 14: Elektrophorese der 5S RNS im 12,5%igen Polyacrylamid-Gel.
(A) 5S RNS Kontrolle,
(B) RNS aus dem nativen 5S RNS-Protein Komplex.

Abbildung 15: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Proteine des nativen 5S RNS-Protein Komplexes.



zigen Komplex mit L5, L18, L25 und der 5S RNS isoliert wurden. Es könnten aber auch L1 und L8/9 an eines der kleinen verunreinigenden RNS-Fragmente gebunden haben oder unspezifisch während der Präparation des 5S RNS-Protein Komplexes in EDTA-Puffer zwischen Fragmenten der 23S RNS und der 5S RNS ausgetauscht worden sein. Der Einfluß von EDTA auf die Bindung von Proteinen an die RNS wird in Abschnitt E.3.3 genauer beschrieben.

Zum endgültigen Beweis, daß der isolierte 5S RNS-Protein Komplex tatsächlich 5S RNS enthielt und nicht ein gleich großes Fragment der 23S RNS, an das die Proteine L5, L18 und L25 unspezifisch gebunden hatten, wurden die folgenden zwei Versuche durchgeführt: (1) Die Proteine L5, L18 und L25 wurden unter spezifischen Salzbedingungen an die RNS gebunden. (2) Die GTPase- und ATPase-Aktivität des Komplexes wurde geprüft.

Das Ergebnis der Bindungstests zeigt Abbildung 16. Alle drei Bindungsproteine (L5, L18 und L25) hatten einen Komplex mit der RNS gebildet. 5S RNS war somit tatsächlich im Komplex vorhanden. Da der native 5S RNS-Protein Komplex außerdem deutliche GTPase- und ATPase-Aktivität aufwies (persönliche Mitteilung von Dr. A.V. Erdmann), bestand kein Zweifel mehr, daß nach der beschriebenen Methode zum ersten Mal die 5S RNS zusammen mit den Bindungsproteinen L5, L18 und L25 direkt aus dem E. coli Ribosom isoliert werden konnte.

E.2.2 Die Stöchiometrie der Proteine im 5S RNS-Protein Komplex

Nach der Reinigung des 5S RNS-Protein Komplexes über eine Sephadex G100 Säule (D.2.2.6.1) und der Trennung der Proteine L5, L18 und L25 im zweidimensionalen Gel (Abb.15) wurden die Proteinflecke im Gel unterschiedlich stark mit Amido-

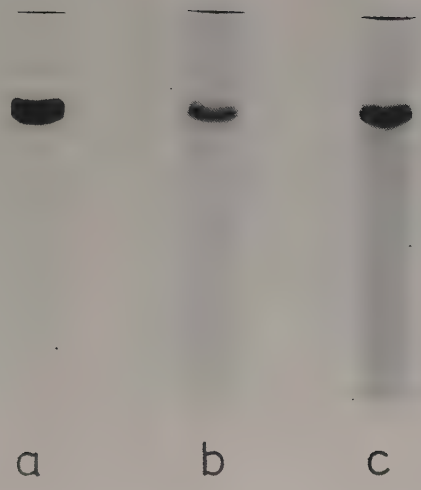


Abbildung 16: Elektrophorese von rekonstituierten 5S RNS-Protein Komplexen in 8%igen Disk-Gelen. (a) 5S RNS + L18; (b) 5S RNS + L5; (c) 5S RNS + L25. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

schwarz gefärbt. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß nicht alle 5S RNS Moleküle alle drei Proteine gebunden hatten. Darum sollte die Zusammensetzung der 5S RNS-Protein Komplexe nach der Elution aus der Sephadex Säule (D.2.2.6.1) analysiert werden. Es gelang, drei Komponenten in 6,5%igen Disk-Gelen zu trennen (Abb.17a). Die Komplexe unterschieden sich, wie die Proteinanalysen in SDS-Gelen (Abb.17b) (D.2.6.6.b) ergaben, um jeweils ein Protein. Komplex III (5S RNS + L25) war am weitesten in das Gel gewandert, dann folgte Komplex II (5S RNS + L18 + L25) und schließlich Komplex I (5S RNS + L5 + L18 + L25). Von Komplex I war verhältnismäßig wenig Material vorhanden. Wahrscheinlich war L5 während der Elektrophorese von der 5S RNS dissoziiert, wodurch Komplex I in Komplex II überging. Alle drei Komplexe enthielten das Protein L25. Protein L18 wurde stets mit Protein L25 nachgewiesen und Protein L5 stets mit den Proteinen L18 und L25. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß eine Abhängigkeit zwischen den Proteinen bei ihrer Bindung an die 5S RNS bestand.

Nach der SDS-Gelelektrophorese ließen sich die Proteine aus Komplex II (L18 und L25) gut mit Coomassie Brilliant Blau (D.1.7) anfärben, wodurch sie mit Hilfe eines Joyce-Loebl Mikrodensitometers quantitativ ausgewertet werden konnten. Die Kurve in Abbildung 18 gibt die Farbintensitäten der beiden Proteinbanden als Gipfelflächen wieder. Mit einem Haff-Planimeter konnte bestimmt werden, daß die Flächeninhalte der beiden Gipfel im Verhältnis L25 : L18 = 1,2 : 1 standen. Da gleiche Gramm-Mengen von L25 1,16mal stärker von Coomassie Brilliant Blau gefärbt werden als L18 (vgl. Eichgeraden in Abb.8) und die Molekulargewichte von L25 (10695) und L18 (12770) unterschiedlich sind, errechnete sich das molare Verhältnis von L25 zu L18 in dem untersuchten Komplex wie folgt:

$$\frac{L25}{L18} = \frac{1,20}{1,16} \times \frac{10695}{12770} = 0,87$$

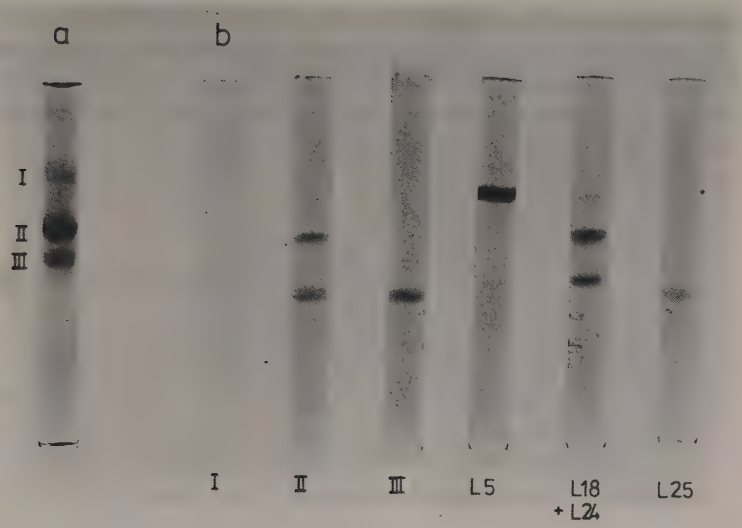


Abbildung 17:

(a) Trennung von drei 5S RNS-Protein-Komplexen (I, II, III) in 6,5%igen Disk-Gelen.

(b) SDS-Gelelektrophorese der Proteine der drei Komplexe (I, II, III) zusammen mit L5, L18 und L24 sowie L25 als Kontrollen.

Berücksichtigt man, daß auch das Folin-Ciocalteu Phenol Reagenz, mit dem die Referenzproteine geeicht wurden (vgl. Abb.8), verschiedene Proteine etwas unterschiedlich färbt, so kann angenommen werden, daß im Komplex II die Proteine L5 und L18 im molaren Verhältnis von 1:1 vorlagen.

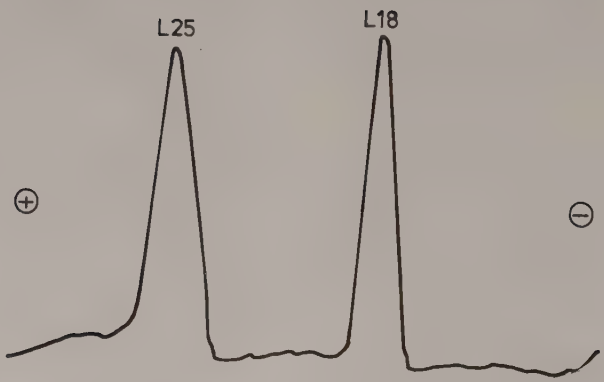


Abbildung 18: Bestimmung der Stöchiometrie der Proteine L18 und L25 in Komplex II (vgl. Abb.17b) durch Vermessen der Proteinmengen im Gel mit Hilfe eines Joyce-Loebl Mikrodensitometers.

Das Protein-Gel von Komplex I (Abb.17b) war nur schwach gefärbt und konnte nur ungenau quantitativ ausgewertet werden. Dennoch ist anzunehmen, daß auch in diesem Komplex die Proteine L5, L18 und L25 im Verhältnis 1:1:1 vorlagen.

E.3 Die 13S und 18S Ribonukleoproteine

E.3.1 Isolierung der 13S und 18S RNPs

Allet und Spahr (1971) hatten berichtet, daß die 23S RNS in intakten 50S Partikeln unter geeigneten Versuchsbedingungen von trägergebundener RNase A nur an einer Stelle in der Nukleotidsequenz geschnitten wird. Die beiden resultierenden großen Fragmente (13S und 18S RNS) konnten als Protein-RNS Komplexe (13S und 18S RNPs) aus den 50S Untereinheiten isoliert werden. Mit dem Ziel, die Proteine in den Komplexen zu identifizieren, wurden die Versuche von mir wiederholt.

In einer enzymkinetischen Untersuchung wurde zunächst das optimale Enzym-Substratverhältnis für die Reaktion gesucht (D.2.5.2). Das Resultat ist in Abbildung 19 zu sehen. Nach der Hydrolyse der 50S Untereinheiten mit trägergebundener RNase A bei einem Verhältnis von (a) 1:100, (b) 1:200, (c) 1:500, (d) 1:1000, (e) 1:2000, (f) 1:3000 und (g) 1:4000 (Gewicht pro Gewicht) wurden die 13S und 18S RNPs in 3%igen Polyacrylamid-Gelen getrennt. Es zeigte sich, daß nur eine geringe Abhängigkeit zwischen der Ausbeute an 13S und 18S RNPs und der eingesetzten Enzymmenge bestand. Eine verminderte Hydrolyse der 23S RNS bei Abnahme der eingesetzten Enzymmenge ließ sich nur anhand der allmählichen Zunahme der 50S Bande ablesen.

Im präparativen Maßstab konnten die 13S und 18S RNPs durch Dichtegradienten-Zentrifugation im Zonalrotor isoliert wer-

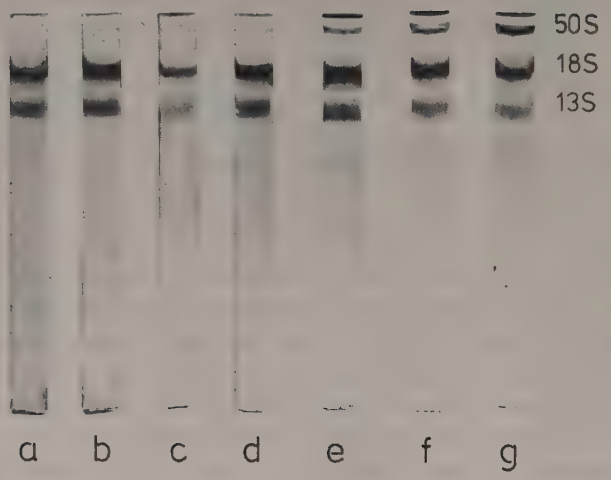


Abbildung 19: Behandlung der 50S Untereinheiten mit unterschiedlichen Mengen trägergebundener RNase A. Die Fragmente (13S und 18S RNPs) wurden in 3%igen Polyacrylamid-Gelen getrennt. Das Enzym-Substratverhältnis (Gewicht pro Gewicht) betrug:
(a) 1:100, (b) 1:200, (c) 1:500, (d) 1:1000, (e) 1:2000, (f) 1:3000, (g) 1:4000.

den (D.2.5.4). Eine gute Trennung der RNPs wurde nur erreicht, wenn nicht mehr als 50 mg der hydrolysierten 50S Partikel auf einen Gradienten aufgetragen wurden (Abb.6). Bei größeren Mengen nahm die wechselseitige Verunreinigung der RNPs stark zu. Die Analyse der Proben in 3%igen Disk-Gelen nach der Gradientenzentrifugation ergab, daß die 13S und 18S RNPs gut getrennt wurden (Abb. 20), denn nur das 18S RNP war vom 13S RNP schwach verunreinigt.

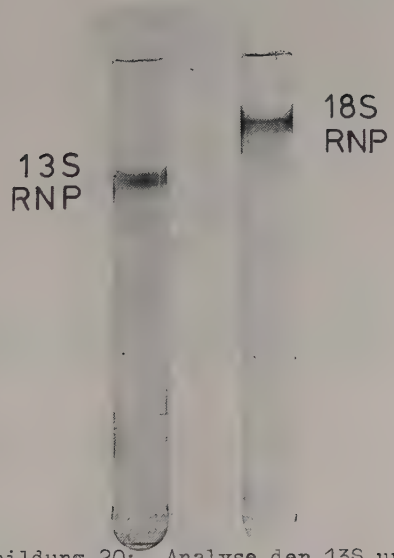


Abbildung 20: Analyse der 13S und 18S RNPs in 3%igen Polyacrylamid-Gelen nach ihrer Trennung im Zonalrotor.

E.3.2 Der Proteingehalt der 13S und 18S RNPs

Nach der Dichtegradienten-Zentrifugation wurde der Proteingehalt der Protein-RNS Komplexe in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und wittmann, 1970a) analysiert. Die 13S und 18S Ribonukleoprotein-Partikel entstammten drei verschiedenen Präparationen: (1) Entsprechend der Originalmethode von Allet und Spahr (1971) wurden die 50S Untereinheiten nach der Hydrolyse mit Ribonuklease A mit 2 M LiCl behandelt (D.2.5.4), wodurch verhindert werden sollte, daß Ribonuklease an die RNPs adsorbierte. (2) Die 50S Untereinheiten wurden nur mit 1 M LiCl "gewaschen". (3) Die 50S Untereinheiten wurden durch Gelfiltration von Spuren der Ribonulease getrennt. Da LiCl auch ribosomale Proteine von den 50S Untereinheiten löst (Homann und Nierhaus, 1971), stand zu erwarten, daß mit der Verminderung der LiCl-Konzentration mehr Proteine in den 13S und 18S RNPs nachgewiesen werden konnten. Abbildung 21 zeigt das Proteinmuster der RNPs, die nicht mit LiCl behandelt wurden. Beide RNPs unterschieden sich in den Proteinen L20 und L21, die nur im 13S RNP vorkamen. Alle übrigen Proteine waren in beiden RNPs vorhanden. Geringe Intensitätsunterschiede der Proteinflecke im Gel waren nicht signifikant, da sie bei verschiedenen Experimenten variierten.

Der Proteingehalt der RNPs nach der Behandlung der 50S Untereinheiten mit 1 M und 2 M LiCl ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Danach waren die Proteine L15, L20 und L21 ausschließlich im 13S RNP, die Proteine L2, L14 und L17 dagegen ausschließlich oder überwiegend im 18S RNP vorhanden. Jede dieser beiden Gruppen enthielt ein primäres Bindungsprotein (L2 und L20) sowie zwei Proteine (L15, L21 und L14, L17), die nicht direkt an die 23S RNS binden. Alle übrigen Proteine verteilten sich auf beide RNPs oder fehlten ganz.

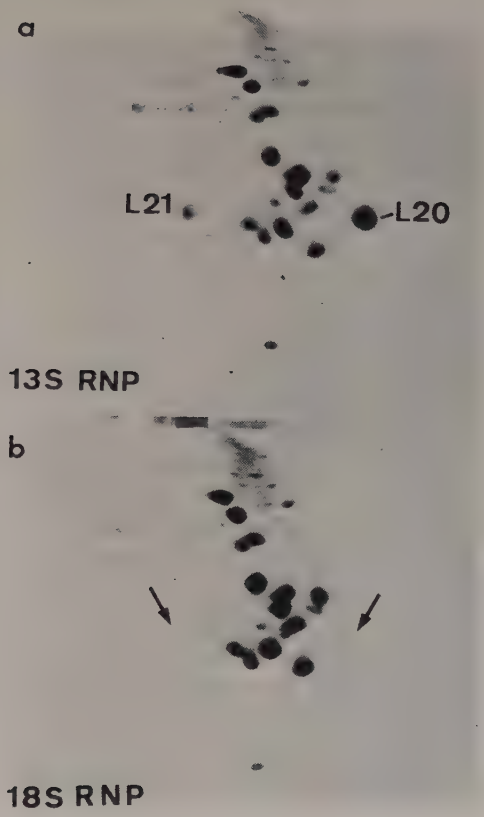


Abbildung 21: Zweidimensionale Auftrennung der Proteine des 13S und des 18S RNPs in Polyacrylamid-Gelplatten. Die Proteine L20 und L21 waren nur im 13S RNP vorhanden.

Tabelle 3: Der Proteingehalt der 13S und 18S RNPs nach der Behandlung der 50S Untereinheiten mit LiCl.

	13S RNP		18S RNP	
Protein	1 M LiCl	2 M LiCl	1 M LiCl	2 M LiCl
L1	+	+	+	+
L2	+	-	+	+
L3	+	+	+	+
L4	+	+	+	+
L5	+	+	+	+
L6	-	-	-	-
L7/12	-	-	-	-
L8/9	+	+	+	+
L10	-	-	-	-
L11	-	-	-	-
L13	+	+	+	+
L14	-	-	+	+
L15	+	-	-	-
L16	-	-	-	-
L17	+	-	+	+
L18	+	+	+	+
L19	+	+	+	+
L20	+	+	-	-
L21	+	+	-	-
L22	+	+	+	+
L23	+	+	+	+
L24	+	+	+	+
L25	-	-	-	-
L26	-	-	-	-
L27	-	-	-	-
L28	-	-	-	-
L29	+	+	+	+
L30	+	+	+	+
L31	-	-	-	-
L32	-	-	-	-
L33	-	-	-	-
L34	-	-	-	-

E.3.3 Unspezifische Proteinbindung in den Komplexen

Nur sechs Proteine kamen in den 13S und 18S RNPs unterschiedlich vor. Dieses Resultat läßt sich auf zwei Weisen deuten: (a) Fast alle Proteine im 50S Partikel besitzen mehrere Bindungsorte und verteilen sich bei der Trennung der RNPs auf beide Partikel. (b) Während der Präparation der RNPs wurden die Proteine zwischen diesen unspezifisch ausgetauscht.
Die zweite Deutung schien sehr wahrscheinlich, da kürzlich berichtet wurde (Newton et al., 1975), daß beim Aufenthalt in EDTA-haltigen Puffern ribosomale Proteine unspezifisch zwischen der kleinen und der großen ribosomalen Untereinheit ausgetauscht werden. Da zur Trennung der 13S und 18S RNPs in Saccharosegradienten ein EDTA-haltiger Puffer verwendet worden war (D.2.5.4), wurde in einem einfachen Kontrollversuch geprüft, ob dieser Effekt die Ursache für das Vorkommen fast aller Proteine in beiden RNPs war (D.2.7.2). Nach Mischung und Inkubation (0°C) des 13S RNPs jeweils mit den gleichen Mengen 16S oder 23S RNS in EDTA-Puffer wurden die RNPs und RNS-Moleküle voneinander elektrophoretisch in Disk-Gelen getrennt. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau (protein-spezifisch) gefärbt. Das Ergebnis (Abb. 22) macht deutlich, daß unter den gegebenen Präparationsbedingungen Proteine tatsächlich zwischen heterogenen RNS-Molekülen ausgetauscht werden können. Mit Hilfe der RNPs konnten die Bindungsorte der Proteine somit nicht bestimmt werden. Versuche, die 13S und 18S RNPs unter anderen Salzbedingungen, z.B. ohne EDTA oder in Gegenwart von Mg^{2+}-Ionen, zu isolieren, schlugen fehl, weil die mit RNase behandelten 50S Untereinheiten nicht in die beiden großen Komplexe dissoziierten. Für die Identifizierung der Proteinbindungsorte auf der 23S RNS mußten daher andere Methoden gewählt werden.

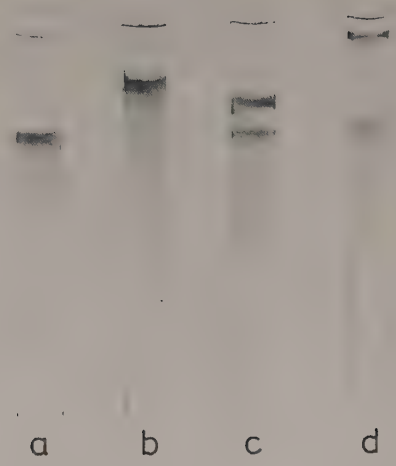


Abbildung 22: Der Austausch von Proteinen zwischen Ribonukleoproteinen und RNS beim Aufenthalt in Lösungen mit geringer Ionenstärke. Gelelektrophorese des (a) 13S RNPs, (b) 18S RNPs, (c) 13S RNPs + 16S RNS, (d) 13S RNPs + 23S RNS in 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, und 1 mM EDTA. Die Gele wurden auf ihren Proteingehalt mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die 16S und 23S RNS wandern ohne Proteine in den gleichen Positionen wie mit Proteinen.

E.3.4 Salzbehandlung der 13S und 18S RNPs

In einem Versuch, die Proteine von den Komplexen zu dissoziieren und anschließend spezifisch bindende Proteine wieder anzulagern, wurden die 13S und 18S RNPs gegen TMK-Puffer (D. 1.4) mit erhöhter KCl-Konzentration (0,8 und 1,6 M KCl) dialysiert (D.2.7), weil mit steigendem KCl-Gehalt im TMK-Puffer die Bindungsstärke zwischen den Proteinen und der RNS abnimmt (Schulte und Garrett, 1972; Schulte et al., 1974). Nachdem die entsprechenden Salzkonzentrationen in den Proben erreicht worden waren, wurden letztere 30 Minuten bei 37°C inkubiert, dann auf Standard-Rekonstitutionsbedingungen (TMK-Puffer) verdünnt und erneut inkubiert, wodurch eine spezifische Wiederanlagerung der dissoziierten Proteine ermöglicht werden sollte.

Nach der Behandlung mit 0,8 M KCl und anschließender Rekonstitution banden fünf Proteine (L2, L14, L17, L19 und L23) ausschließlich an die 18S RNS (Abb. 23) und zwei Proteine (L20 und L21) ausschließlich an die 13S RNS. Nachdem die Salzkonzentration auf 1,6 M KCl erhöht und die Rekonstitution durchgeführt wurde, waren die Proteine L2, L17, L19 und L23 sowie zusätzlich L8 und/oder L9 nur im 18S RNP vorhanden. Ausschließlich oder sehr viel stärker als im 18S RNP wurden die Proteine L4, L11, L13, L15, L22 und L24 im 13S RNP nachgewiesen. Die Proteine L14 (18S RNP) und L20 und L21 (13S RNP) fehlten nach der Inkubation in 1,6 M KCl. Wahrscheinlich waren sie unter den Salzbedingungen präzipitiert. Einige Proteine (L1, L3, L4, L13, L15, L22, L24) waren, wenn auch mit deutlichen Intensitätsunterschieden, in beiden RNPs nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß entweder nicht alle unspezifischen Effekte durch die Salzbehandlung eliminiert worden waren, oder daß für einige Proteine tatsächlich mehrere Bindungsstellen im 50S Partikel angenommen werden müssen.

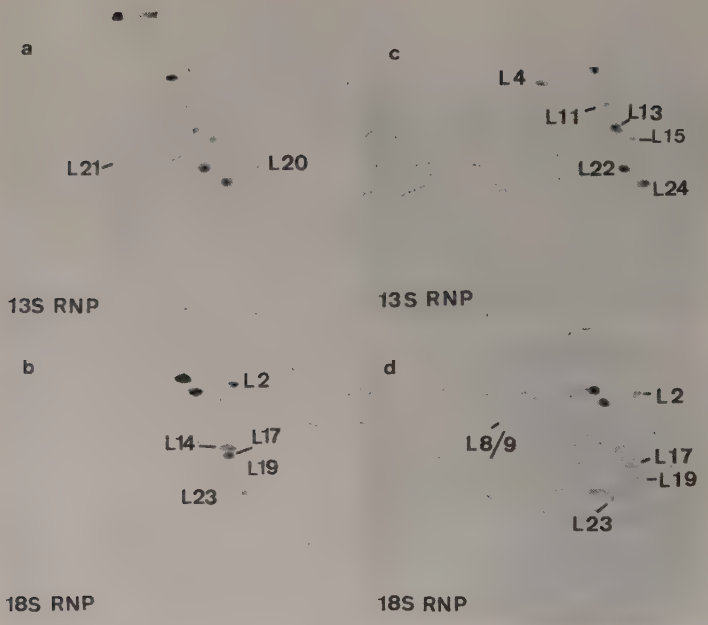


Abbildung 23: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen in den 13S und 18S RNPs. (a,b) Die 13S und 18S RNPs wurden nach der Gradientenzentrifugation (D.2.5.4) mit 0,8 M KCl behandelt, um unspezifisch gebundene Proteine von den RNPs zu lösen. Sie wurden anschließend mit den dissoziierten Proteinen unter Standard-Rekonstitutionsbedingungen inkubiert, um die Wiederanlagerung spezifisch bindender Proteine, die durch die Salzbehandlung ebenfalls abgetrennt wurden, zu ermöglichen. Abb.c und d zeigen die 13S und 18S RNPs nach der Behandlung mit 1,6 M KCl und nach spezifischer Rekonstitution mit einigen Proteinen.

Tabelle 4: Proteine, die spezifisch an die 13S und 18S RNS rekonstituiert werden konnten, nachdem sie von unspezifischen Bindungsorten in den 13S und 18S RNPs mit 0,8 oder 1,6 M KCl extrahiert worden waren.

Mole KCl	13S RNS	18S RNS
0,8	L20 L21	L2 L14 L17 L19 L23
1,6	L4 L11 L13 L15 L22	L2 L8/9 L17 L19 L23

E.4 Die 13S, 18S und 11S RNS sowie kleinere Fragmente der 23S RNS

E.4.1 Der Einfluß von Mg^{2+}-Ionen auf die Hydrolyse der 23S RNS

Zur Isolierung der 13S und 18S RNS wurden die 50S Partikel (wie zur Isolierung der 13S und 18S RNPs) bei einem Enzym: Substratverhältnis von 1:3000 (Gewicht pro Gewicht) mit trägergebundener RNase A verdaut (D.2.8.1). Die Mg^{2+}-Konzentration im Hydrolysepuffer wurde bei 1 mM gehalten, da bereits bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 0,1 mM die 23S RNS weitgehend in kleinere Fragmente zerlegt wurde. In Abbildung 24 sind die Fragmentmuster der 23S RNS zu sehen, die bei der Hydrolyse der 50S Partikel in 0.01, 0.1, 4 x 0.1, 7 x 0.1, 1 und 2 mM $MgAc_2$ entstanden waren. Mit der Verminderung der Mg^{2+}-Konzentration

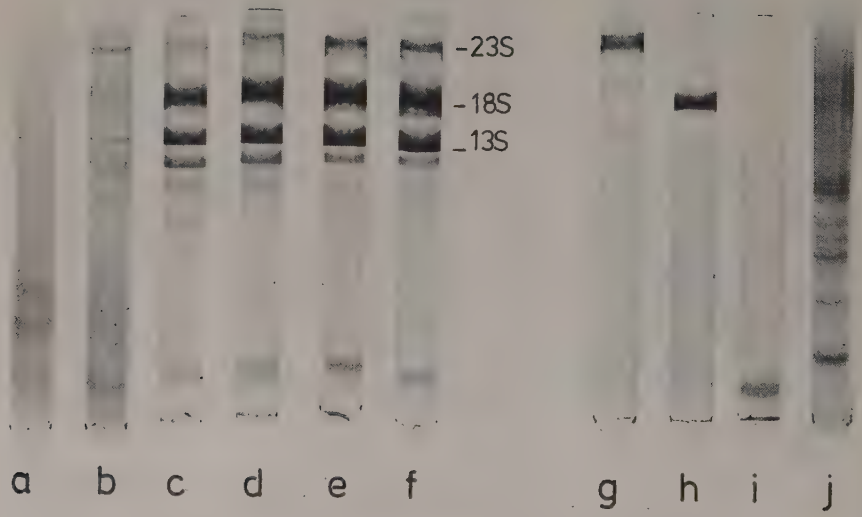


Abbildung 24: Fragmente der 23S RNS nach der Hydrolyse der 50S Untereinheiten mit trägergebundener RNase A in (a) 0.01, (b) 0.1, (c) 4 x 0.1, (d) 7 x 0.1, (e) 1, (f) 2 mM $MgAc_2$. Als Kontrollen wurden (g) 23S RNS, (h) 16S RNS und (i) 5S RNS auf die 3%igen Gele aufgetragen. (j) Fragmente, die bei der Hydrolyse der 23S RNS mit trägergebundener RNase A in 1 mM $MgAc_2$ entstanden.

im Hydrolysepuffer wurde die 18S RNS gegenüber der 13S RNS immer stärker hydrolysiert. Gleichzeitig traten zwei Banden unterhalb der 13S RNS in den Gelen deutlich hervor. Offenbar wurde beim Übergang von 1 mM auf 0,4 mM $MgAc_2$ eine zweite Region der 23S RNS so freigelegt, daß auch sie von der trägergebundenen RNase A angegriffen werden konnte. Da die beiden kleineren Fragmente, wenn auch viel schwächer, bereits bei der Hydrolyse in 1 und 2 mM $MgAc_2$ zu beobachten waren, muß angenommen werden, daß ein Teil der 50S Untereinheiten auch bei diesen Mg^{2+}-Konzentrationen in der RNase-sensibleren Form vorlag.

Wenn die 23S RNS in 1 mM $MgAc_2$ mit trägergebundener RNase A unter identischen Bedingungen wie die 50S Partikel verdaut wurde, wurde sie fast vollständig in kleinere Fragmente zerlegt (Abb.24j). Das Ergebnis zeigt anschaulich den Schutz der 23S RNS durch die Proteine in dem 50S Partikel.

E.4.2 Größe und Oligonukleotidmuster der RNS-Fragmente

Zur exakten Charakterisierung der RNS-Fragmente wurden diese radioaktiv (^{32}P-Markierung) isoliert (D.2.8.2 bis D.2.8.4). Die ^{32}P-13S RNS und die ^{32}P-18S RNS wurden aus 50S Untereinheiten isoliert, die in 1 mM $MgAc_2$ hydrolysiert worden waren (Abb. 25a), während die kleineren Fragmente (11S, A, B und C) aus einer Hydrolyse in 0.4 mM $MgAc_2$ hervorgingen (Abb. 25b). Die Größe der 13S und 18S RNS war in der Literatur mit etwa 1300 und 1800 Nukleotiden angegeben worden (Allet und Spahr, 1971; Branlant et al., 1975a). Auf Grund ihrer Wanderung in Polyacrylamid-Gelen im Vergleich zur 18S RNS, 13S RNS und 5S RNS konnte die Größe der kleineren Fragmente wie folgt bestimmt werden:

Fragment A	:	etwa 1230 Nukleotide
11S Fragment	:	etwa 1140 Nukleotide
Fragment B	:	etwa 750 Nukleotide
Fragment C	:	etwa 600 Nukleotide

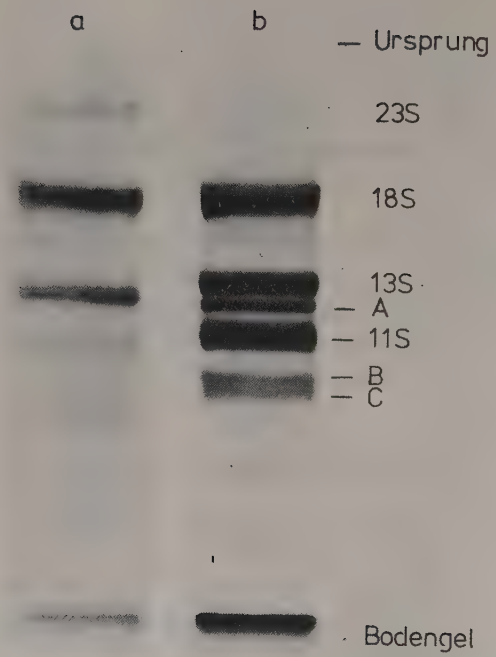


Abbildung 25: Autoradiographie ^{32}P-markierter Fragmente der 23S RNS nach der Hydrolyse der 50S Untereinheiten mit trägergebundener RNase A in (a) 1 mM $MgAc_2$ und (b) in 0.4 mM $MgAc_2$. Die Fragmente wurden in zwei getrennten Läufen in 3%igen Polyacrylamid-Gelen analysiert.

Analog zu den 13S und 18S RNS-Fragmenten wurde das 11S Fragment nach seiner Größe als 11S RNS definiert. Fragment A trat nur in einigen Experimenten auf, während die Fragmente B und C stets neben dem 11S Fragment nachgewiesen wurden.

Nachdem die ^{32}P-markierten Fragmente aus dem Gel isoliert worden waren (D.2.8.4), wurden sie mit Ribonuklease T_1 und alkalischer Phosphatase verdaut (D.2.8.5). Ihre Oligonukleotide wurden anschließend zweidimensional auf Zelluloseazetat und DEAE-Papier getrennt. Die Oligonukleotidmuster der Fragmente sind in Abbildung 26 dargestellt. Die Muster der 13S und 18S RNS sind identisch mit denen von Spierer et al. (1975). Auf Grund der Oligonukleotidkarten konnte außerdem geschlossen werden, daß Fragment A ein Subfragment der 13S RNS war, während die Fragmente B und C sowie das 11S Fragment von der 18S RNS stammten.

Durch sekundäre Analyse der in Abbildung 26 mit einem Pfeil markierten Oligonukleotide konnte nachgewiesen werden, daß die 11S RNS wie die 18S RNS das terminale Oligonukleotid der 23S RNS mit der Bruttozusammensetzung 4U, 2C, AAC enthielt und somit vom 3'-Ende der 23S RNS stammte.

Legende zu Abbildung 26a und 26b:

Oligonukleotidkarten der 13S, 18S und 11S RNS sowie der Fragmente A, B und C. Die RNS-Moleküle waren in einer kombinierten Hydrolyse mit RNase T_1 und alkalischer Phosphatase verdaut worden. Die Pfeile in den Karten der 11S und 18S RNS bezeichnen die Oligonukleotide vom 3'-Ende der 23S RNS.

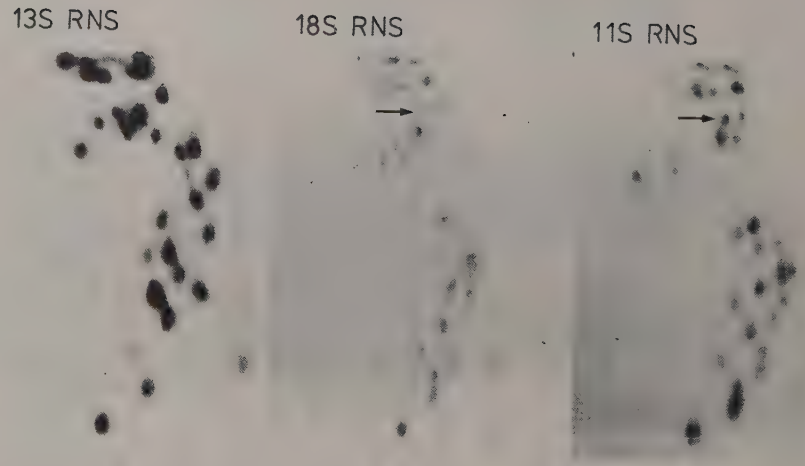


Abbildung 26a: Legende siehe Seite 79

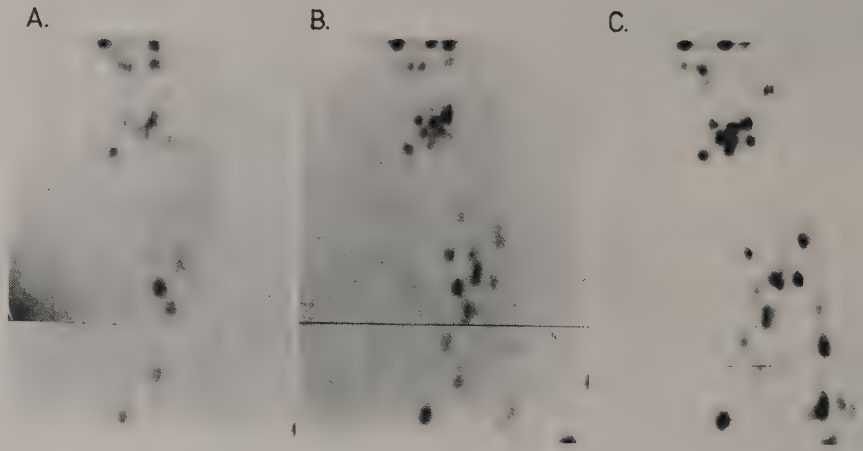


Abbildung 26b: Legende siehe Seite 79

E.4.3 Präparative Isolierung der 13S, 18S und 11S RNS

Für Rekonstitutionsexperimente wurden größere Mengen der RNS-Fragmente benötigt. Diese wurden darum im Saccharosegradienten (D.2.9.2) vorfraktioniert, wobei die 18S RNS direkt sauber gewonnen werden konnte (Abb. 11 und Abb. 27a). Die 13S RNS sedimentierte dagegen gemeinsam mit der 11S RNS (Abb. 11 und Abb. 27a). Beide konnten nur elektrophoretisch in Polyacrylamid-Gelen getrennt werden und mußten präparativ aus diesen gewonnen werden (D.2.9.3).

E.4.4 Unversehrtheit der RNS-Fragmente nach der Gradientenzentrifugation

Alle drei großen Fragmente der 23S RNS waren während der Hydrolyse kaum an anderen Stellen der Sequenz von der RNase A angegriffen worden, und auch während ihres Aufenthaltes im Saccharosegradienten (D.2.9.2) waren sie nicht degradiert worden, denn das Fragmentmuster (Abb. 27b) der (a) 13S + 11S RNS und (b) der 18S RNS in 8-molaren Harnstoffgelen (3 % Polyacrylamid; D.1.5) war fast identisch mit dem Muster in Gelen ohne Harnstoff (Abb. 27a). Neben der 13S und 11S RNS waren im 8-molaren Harnstoffgel nur einige schwache zusätzliche Banden zu sehen. Die 18S RNS war dagegen etwas stärker in 2 große Fragmente zerlegt, die auf Grund ihres R_f-Wertes im Gel wahrscheinlich der 11S RNS und dem Reststück der 18S RNS entsprachen.

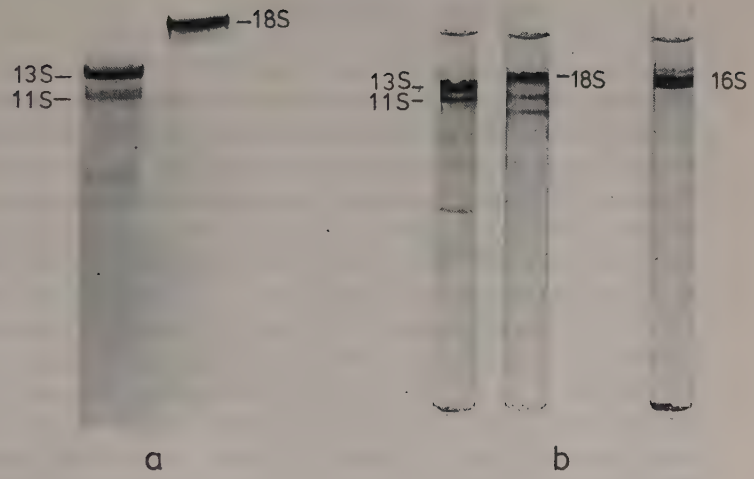


Abbildung 27a: Elektrophorese der 13S, 18S und 11S RNS in einer 4%igen Gelplatte nach ihrer Fraktionierung im Saccharose-Dichtegradienten.

Abbildung 27b: Elektrophorese der 13S, 18S und 11S RNS in 3%igen Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von 8-molarem Harnstoff.

Als Kontrolle wurde 16S RNS aufgetragen.

E.5 Proteinbindungsorte auf der 23S RNS

E.5.1 Die Rekonstitutionsexperimente

Äquivalente Mengen der 13S, 18S und 11S RNS wurden in Standard-Rekonstitutionspuffer mit einem zweifach molaren Überschuß an tritiierten Proteinen der 50S Untereinheit und zwei Äquivalenten 5S RNS inkubiert (D.2.10.1). Die entstandenen Protein-RNS Komplexe wurden anschließend von ungebundenen Proteinen durch Gelfiltration getrennt. Danach wurden die Proteine von der RNS extrahiert, elektrophoretisch getrennt und auf ihre Radioaktivität analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Zahlen geben den Prozentsatz der gebundenen Proteine gegenüber einer maximalen Bindung von 1:1 der Proteine an die RNS an. Nur für das Proteinpaar L7/L12 wurden drei Kopien pro Ribosom (Hardy, 1975) angenommen. Bindung unterhalb von 5 % wurde als nicht signifikant angesehen, da ein so geringer Prozentsatz von wechselseitigen Verunreinigungen der Proteine im zweidimensionalen Gel herrühren konnte.

In Tabelle 6 wurden die Proteine in sechs Gruppen klassifiziert, je nachdem ob sie ausschließlich an (1) die 13S RNS oder (2) die 18S RNS, (3) überwiegend an die 13S RNS oder (4) überwiegend an die 18S RNS, (5) an die 18S RNS und an die 11S RNS oder (6) nur an die 18S RNS und nicht an die 11S RNS banden. Auf diese Weise konnten 24 der 34 Proteine der 50S Untereinheit entweder ausschließlich oder hauptsächlich einem der drei großen Bereiche der 23S RNS zugeordnet werden:

1. der 13S RNS vom 5'-Ende der 23S RNS bis zum Nukleotid 1300,
2. der zentralen Region der 23S RNS zwischen den Nukleotiden 1300 und 2000,
3. der 11S RNS vom Nukleotid 2000 bis zum 3'-Ende der 23S RNS.

Tabelle 5: Rekonstitution von tritiierten Proteinen der 50S Untereinheit an die 13S, 18S und 11S RNS. In der Tabelle sind die Ergebnisse eines von insgesamt 4 Versuchen zusammengefaßt. Die Zahlen geben den Prozentsatz der gebundenen Proteine gegenüber einem maximalen Bindungsverhältnis von Proteinen zu RNS von 1:1 an. Die Proteine L25 und L29 (in Klammern) konnten nur in einem Versuch nachgewiesen werden.

Protein	13S RNS	18S RNS	11S RNS
L1	10	38	35
L2	-	31	-
L3	9	31	30
L4	24	8	-
L5	25	32	31
L6	-	8	-
L7/12	33	8	10
L8/9	22	35	30
L11	8	-	-
L13	12	-	-
L14	-	13	-
L16	-	7	-
L17	-	10	-
L18	-	12	8
L19	-	13	-
L20	77	37	28
L21	29	9	9
L22	23	8	-
L23	-	26	-
L24	27	-	-
L25	-	(9)	-
L27	-	28	28
L29	(10)	-	-

Tabelle 6: 24 Proteine der 50S Untereinheit wurden nach ihrer Eigenschaft, sich in Rekonstitutionsexperimenten an die 13S, 18S oder 11S RNS anzulagern, in sechs Gruppen eingeteilt. Entsprechend ihrer ausschließlichen oder hauptsächlichen Bindung an die drei Fragmente konnten sie drei großen Bereichen der 23S RNS zugeordnet werden (vgl. auch Abb. 28).

Gruppe (I)	Gruppe (II)	Gruppe (III)
ausschließlich 13S	hauptsächlich 13S	ausschließlich 18S
L11	L4	L2
L13	L7/L12	L6
L24	L20	L14
(L29)	L21	L16
	L22	L17
		L18
		L19
		L23
		(L25)

Gruppe (IV)	Gruppe (V)	Gruppe (VI)
hauptsächlich 18S	Bindung an 11S und 18S	Bindung an 18S u.nicht an 11S
L1	L1	L2
L3	L3	L6
L5	L5	L14
L8/L9	L8/L9	L16
	L18	L17
	L27	L19
		L23

Es wurde angenommen, daß diejenigen Proteine, die an die 18S RNS, nicht aber an die 11S RNS, banden, die zentrale Region der 23S RNS für ihren Einbau in das Ribosom benötigen.

Bei der Bewertung der Rekonstitutionsergebnisse traten folgende Schwierigkeiten auf:

1. Während einige Proteine ausschließlich an die 13S RNS oder die 18S RNS banden, zeigten andere dagegen deutliche Affinität zu beiden Fragmenten (Tab.5). Es ist möglich, daß diese Eigenschaften die Vielfalt der Wechselwirkungen im Ribosom widerspiegeln, indem ein Protein mehrere Kontaktstellen zur 23S RNS bzw. zu verschiedenen Nachbarproteinen (oder zu beiden) besitzen kann. Ein gutes Beispiel dafür ist das Protein L5: In den Rekonstitutionsexperimenten band es fast gleich stark sowohl an die 11S RNS und die 18S RNS als auch an die 13S RNS (Tab.5).

2. Die Proteine L8 und L9 wurden in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht getrennt. Da eine starke Komplexbildung mit der 13S, 18S und 11S RNS erfolgte, ist es möglich, daß beide Proteine in verschiedenen Regionen an die 23S RNS binden. Andererseits ist bisher noch ungeklärt, ob L8 tatsächlich ein ribosomales Protein ist, oder ob es sich um ein Aggregat aus den Proteinen L7/L12 und L10 handelt (Pettersson et al., 1976).

3. Das Protein L15 konnte keinem Fragment der 23S RNS eindeutig zugeordnet werden, weil die Resultate verschiedener Versuche nicht übereinstimmten. In den meisten Rekonstitutionsversuchen mit tritiierten Proteinen band L15 stärker an die 18S RNS, während es nach der Extraktion der Proteine von den 13S und 18S RNPs mit 1,6 M KCl hauptsächlich an die 13S RNS rekonstituiert wurde (Abb. 23). Darüber hinaus war L15 nach der LiCl-Behandlung RNase-behandelter 50S-Untereinheiten nur im 13S RNP nachweisbar (Tabelle 3).

4. Das Protein L20 band sehr stark an die 13S, 18S und 11S RNS. Dies war wahrscheinlich auf unspezifische Bindungseffekte zurückzuführen, die bereits früher von Garrett et al. (1974) und Spierer et al. (1975) beschrieben wurden. Diese Autoren stellten fest, daß bei einem Überschuß von L20 über die 23S RNS mehr als ein Molekül L20 an die 23S RNS band, und daß sogar bei einem 20-molaren Überschuß des Proteins keine Sättigung erreicht wurde.

5. Die Proteine L28 bis L33, die Molekulargewichte zwischen 5000-7000 haben, konnten nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Sie waren wahrscheinlich während der Dialyse nach der Extraktion der Proteine von den Komplexen verlorengegangen. Außerdem wurde das Protein L34 unter Standardbedingungen im zweidimensionalen Gel nicht nachgewiesen. Deshalb konnten keine Angaben über diese Proteine gemacht werden.

E.5.2 Die Proteinbindungstests

Einzelne Proteine, die unabhängig von anderen Proteinen an die 23S RNS binden können (Garrett et al., 1974a), wurden mit der 18S RNS und einer Mischung aus 13S und 11S RNS inkubiert und in Disk-Gelen geprüft, ob sie einen Komplex mit einem der großen Fragmente bilden konnten (D.2.10.2). Die Ergebnisse stimmten mit den Resultaten von Spierer et al. (1975) insofern überein, als die Proteine L4, L20 und L24 an die 13S RNS und die Proteine L1, L2, L3, L6, L16 und L23 an die 18S RNS banden. Die Proteine L6 und L16 banden allerdings nur sehr schwach. Das Protein L13 konnte dagegen nicht, wie bei Spierer et al. (1975) beschrieben, an die 13S RNS gebunden werden. Es bildete vielmehr in den Rekonstitutionsversuchen zusammen mit anderen Proteinen einen Komplex mit der 13S RNS. An die 11S RNS banden nur die Proteine L1 und L3. Sie bestätigten damit das Ergebnis der Rekonstitutionsexperimente.

F. Diskussion

F.1 Die Reaktivität der Proteine im 50S Partikel gegenüber Formaldehyd

Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung hatten Hill et al. (1969) die ungefähre Form des 50S Partikels bestimmt. Danach handelt es sich um ein ellipsoides Partikel mit den Maßen 115 Å x 230 Å x 230 Å. Dieses Volumen würde es erlauben, daß die Proteine in den 50S Untereinheiten in mehreren Schichten übereinander gelagert sind. Zur Bestimmung, welche Proteine in den 50S Untereinheiten Aminogruppen besitzen, die *in situ* für chemische Reagenzien erreichbar sind, wurden in dieser Arbeit die Untereinheiten mit radioaktivem Formaldehyd reduktiv methyliert. Die Umsetzung erfolgt sehr schnell und unter milden Bedingungen (0°C; pH 8.5), ohne daß die Bindungsfähigkeit der ribosomalen Proteine an die RNS oder die wichtigsten Funktionen des Ribosoms wesentlich geändert werden (Moore und Crichton, 1973; Amons und Möller, 1974).

Das Ausmaß der Methylierung ribosomaler Proteine *in situ* wird von verschiedenen Faktoren beeinflußt: Aminogruppen an der Ribosomenoberfläche werden schneller methyliert als solche, die sich im Innern des Partikels befinden, oder die durch Nachbarschaftseinflüsse extrem hohe pK-Werte besitzen. Außerdem werden all diejenigen Aminogruppen nicht methyliert, die an Salz- oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Proteinen oder Proteinen und RNS beteiligt sind.

Meine Ergebnisse über die Methylierung der Proteine in den 50S Untereinheiten stimmen im wesentlichen mit den Resultaten von Moore und Crichton (1973) überein. Relativ viele Aminogruppen wurden in den Proteinen L7/L12 > L1 > L11 > L25 > L29 > L8 und/oder L9 > L5 > L6 > L33 > L4 > L30 > L19 modifiziert. Unter diesen Proteinen sind drei, die direkt an die 23S RNS binden, während die übrigen Bindungsproteine (L2, L3, L13,

L16, L20, L23 und L24) nur schwach methyliert wurden. Dieses Ergebnis könnte auf die Beteiligung der α- und ε-Aminogruppen der Bindungsproteine an der Protein-RNS-Wechselwirkung zurückzuführen sein.

F.2 Der 5S RNS-Protein Komplex

Durch milde Hydrolyse der 23S RNS im intakten 50S Partikel und anschließende Entfaltung durch Behandlung mit EDTA wurde die 5S RNS zum ersten Male zusammen mit den Proteinen L5, L18 und L25 direkt aus dem Ribosom von Escherichia coli isoliert. Drei unterschiedliche Komplexe wurden isoliert, die jeweils aus der 5S RNS und aus den Proteinen L25 bzw. L25 plus L18 bzw. L25 plus L18 plus L5 bestanden. Die Proteine lagen in allen Komplexen in äquimolaren Mengen vor. Dieses Resultat widerspricht früheren Daten über das Vorhandensein von zwei Molekülen L18 in der 50S Untereinheit (Weber, 1972; Gray et al., 1973) und bestätigt das Ergebnis von Hardy (1975) über die Stöchiometrie der Proteine des 5S RNS-Protein Komplexes im Ribosom.

Der 5S RNS-Protein Komplex wurde in seiner nativen Form isoliert, da er GTP und ATP hydrolysiert. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß einige 5S RNS-Moleküle partiell denaturiert waren, weil L5 und L18 nicht an alle 5S RNS-Moleküle banden. Daraus ließe sich ableiten, daß die Bindungsorte von L5 und L18 gegenüber EDTA-Behandlung empfindlicher sind als der Bindungsort von L25. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß L25 am festesten und L5 am schwächsten an die 5S RNS bindet, während L18 eine Mittelstellung einnimmt. Da darüber hinaus L18 nie ohne L25 und L5 nie ohne L18 und L25 im Komplex nachgewiesen wurden, ist eine Kooperativität ihrer Bindung an die 5S RNS nicht auszuschließen. Die Versuche von Feunteun et al. (1975) wiesen bereits darauf hin, daß die Bindung von L18 durch die Gegenwart der Proteine L5

und L25 stabilisiert wird.

Die Integration der 5S RNS in das Ribosom erfolgt durch die Wechselwirkung des 5S RNS-Protein Komplexes mit dem 11S Fragment der 23S RNS zwischen den Nukleotiden 2000 und 2400 (Gray et al., 1972; Brimacombe und Sloof et al., unpublizierte Ergebnisse). Beim Entfalten der 50S Untereinheiten in Gegenwart von EDTA bleiben die beiden Proteine im Ribosom gebunden, während die 5S RNS zusammen mit dem Protein L25 dissoziiert (Garrett et al., 1974b). Erst nachdem in meinen Versuchen die 23S RNS nahe dem Nukleotid 1300 hydrolysiert wurde, konnten die Bindungsorte der Proteine L5 und L18 auf der 23S RNS durch die EDTA-Behandlung so destabilisiert werden, daß die 5S RNS zusammen mit allen drei Proteinen, die an sie binden, vom Ribosom gelöst wurde.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Bindung der Proteine L5 und L18 an das 18S RNP durch den zweiten Schnitt innerhalb der 18S RNS beim Nukleotid 2000 der 23S RNS (11S Fragment) gelöst wurde, da unter den Präparationsbedingungen die überwiegende Mehrheit der 18S RNS Moleküle dort nicht gespalten wurde (vgl. Abb.11 und Abb.27). Andererseits wurde L25 ganz und die Proteine L5 und L18 fast quantitativ aus dem 18S RNP gelöst (Abb. 21). Das Ergebnis läßt daher den Schluß zu, daß ein Bereich der 23S RNS,der etwa 1000 Nukleotide vom Bindungsort des 5S RNS-Protein Komplexes entfernt liegt, eine stabilisierende Wirkung auf diesen ausübt.

F.3 Die Topographie der Proteine und der RNS im 50S Partikel

F.3.1 Die Zugänglichkeit der RNS in den 50S Untereinheiten gegenüber trägergebundener RNase A

Durch die Behandlung intakter 50S Untereinheiten mit trägergebundener pankreatischer RNase A konnte die 23S RNS in zwei große Fragmente (13S und 18S RNS) gespalten werden. Die Re-

aktion war stark von der Mg^{2+}-Ionenkonzentration im Hydrolysepuffer abhängig. Bei 10^{-4} M Mg^{2+} wurde die 23S RNS in viele kleine Bruchstücke zerlegt. Zwischen 10^{-3} und 4×10^{-4} M Mg^{2+} wurde eine zweite Stelle der 23S RNS für die trägergebundene RNase A erreichbar, so daß die 18S RNS in zwei Fragmente von etwa 700 und 1100 Nukleotiden gespalten wurde. Da bisher nicht beobachtet wurde, daß Proteine bei der Erniedrigung der Mg^{2+}-Konzentration von den 50S Untereinheiten dissoziierten, so daß auf diese Weise neue Stellen in der 23S RNS freigelegt wurden, ist anzunehmen, daß sich die Tertiärstruktur der 23S RNS allmählich auflockerte, so daß zunächst zwei Stellen und dann viele Stellen von der trägergebundenen RNase A erreicht werden konnten.

Die 5S RNS wurde von der trägergebundenen RNase A nicht hydrolysiert. Sie konnte trotz der Nukleasenbehandlung intakt aus den 50S Untereinheiten isoliert werden (vgl. auch F.2).

F.3.2 Die Proteinbindungsorte auf der 23S RNS

In dieser Arbeit konnten neben 10 primären Bindungsproteinen auch 14 Proteine, die nicht allein an die 23S RNS binden können, je einem der beiden großen Fragmente der 23S RNS (13S und 18S RNS) zugeordnet werden. Die Ergebnisse entstammen vier verschiedenen Versuchen:

1. Identifizierung derjenigen Proteine, die ausschließlich im 13S oder im 18S RNP vorkamen.
2. Identifizierung der Proteine im 13S und 18S RNP, die nach dem Abwaschen unspezifisch gebundener Proteine und nachfolgender spezifischer Rekonstitution an die 13S und 18S RNS banden.
3. Rekonstitutionsexperimente für jedes der Fragmente mit den Proteinen der 50S Untereinheit.
4. Bindungstests von Einzelproteinen mit der 13S und der 18S RNS.

Die Resultate bestätigen die Positionen der Bindungsorte von L1, L20, L23 und L24 auf der 23S RNS (Branlant et al., 1973; Branlant et al., 1975a) sowie die Positionen der Bindungsproteine L2, L3, L4, L6 und L16 auf der 13S oder der 18S RNS (Spierer et al., 1975). Nur das Protein L13 konnte nicht an die 18S RNS gebunden werden. Es bildete zusammen mit den anderen Proteinen einen Komplex mit der 13S RNS.

Neben den primären Bindungsproteinen L4, L20 und L24 gehören auch die Proteine L7/12, L11, L13, L21, L22 und L29 zur 13S RNS. Und neben den Bindungsproteinen L1, L2, L3, L6, L16 und L23 gehören die nicht-bindenden Proteine L9 (L8), L14, L17, L19, L27 sowie die Proteine des 5S RNS-Protein Komplexes (L5, L18 und L25) zur 18S RNS. In meinen Versuchen wurden die Proteine L8 und L9 nicht getrennt; aus den Daten von Newton und Brimacombe (1974) geht jedoch hervor, daß L1 und L9 im Ribosom benachbart sind. L9 sollte darum zur 18S RNS gehören (Abb. 28a). Ein besonderes Problem stellt das Protein L8 dar. Bisher besteht noch keine Übereinstimmung darüber, ob L8 tatsächlich ein ribosomales Protein ist, oder ob es ein Aggregat aus den Proteinen L7/L12 und L10 ist (Pettersson et al.,1976). Falls die zweite Annahme zutrifft, läßt sich die starke Radioaktivität von L8/9 im 13S RNP durch die Radioaktivität von L7/L12 erklären.

Durch die präparative Isolierung des 11S Fragments gelang es, zwischen Proteinen, die zwischen den Nukleotiden 1300 und 2000 und jenen, die im Bereich der letzten 1100 Nukleotide an die 23S RNS binden, zu unterscheiden. In Rekonstitutionsversuchen bildeten die Proteine L1, L3, L5, L8/9, L18 und L27 einen Komplex mit dem 11S Fragment (Abb. 28b). In Bindungstests mit Einzelproteinen wurden die Bindungsorte von L1 und L3 auf dem 11S Fragment bestätigt. Für Proteine, die zwar mit der 18S RNS, nicht aber mit der 11S RNS einen Komplex bilden konnten, wurde angenommen, daß sie die zentrale Region der 23S RNS für ihren Einbau in das Ribosom benötigen. Entsprechend wurden sie in Abb. 28b plaziert. Die Annahme, daß die

Proteine zwischen den Nukleotiden 1300 und 2000 an die 23S RNS binden, war berechtigt, weil das 11S Fragment nach der RNase-Behandlung keine zusätzlichen Schnitte aufwies (E.4.4), durch die die Bindungsorte der fehlenden Proteine hätten zerstört werden können. Hierin unterschied sich das 11S Fragment von dem 8S Fragment der 16S RNS, das Zimmermann et al. (1972) isolierten; denn jenes Fragment enthielt viele versteckte Schnitte, wodurch es seine Eigenschaft, das Protein S7 zu binden, verloren hatte.

Einige Proteine banden an die 13S und an die 18S RNS. Am deutlichsten war dies am Protein L5 zu beobachten (vgl. Tabelle 3, E.5.1). Aber auch die Proteine L1, L3, L4, L7/L12, L21 und L22 banden deutlich an beide Fragmente. Die starke Bindung von L20 an die 18S RNS war wahrscheinlich auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen, wie sie bereits früher beschrieben wurden (Garrett et al., 1974a; Spierer et al., 1975). Für die Proteine L1, L3, L4, L5, L7/L12, L21 und L22 sprechen die Ergebnisse dafür, daß sie tatsächlich direkte oder indirekte Bindungsorte auf beiden Fragmenten der 23S RNS besitzen. Dies bedeutet, daß sie im Ribosom mit mindestens zwei entfernten Bereichen der 23S RNS, mit zwei Proteinen oder mit einer Stelle der 23S RNS und einem Protein in Wechselwirkung treten.

Kurz vor dem Abschluß dieser Arbeit erschien eine neue Veröffentlichung von Spierer und Zimmermann (1976), in der sie zusätzlich zu den 10 primären Bindungsproteinen (Spierer et al., 1975) weitere sechs Proteine der 13S oder der 18S RNS zuordneten. Sie zeigten, daß die Proteine L21 und L22 mit der 13S RNS assoziierten, wenn gleichzeitig die Proteine L20 und L24 gebunden waren, während die Proteine L5, L10, L11, L17 und/oder L27 die Gegenwart der Proteine L1, L2, L3, L6, L13, L16 und L23 für ihre Bindung an die 18S RNS benötigten. Auf Grund ihrer Ergebnisse konnten sie schließen, daß das Protein L20 an der Bindung von L21 und das Protein L24 an der Bindung von L22 beteiligt ist. Außerdem stellten sie direkte Beziehun-

gen zwischen den Proteinen L17 und/oder L27 und einem Komplex aus den Proteinen L1, L3, L6, L13 und L23 fest und für die Proteine L5, L10, L11 zu den Proteinen L2 und L16.

Die neuen Ergebnisse von Spierer und Zimmermann bestätigten im wesentlichen meine Resultate, nach denen die Proteine L21 und L22 auf der 13S RNS und die Proteine L5, L14, L17 und L27 auf der 18S RNS nachgewiesen wurden. Für das Protein L10 konnte in meinen Versuchen keine eindeutige Zuordnung durchgeführt werden, weil die Rekonstitutionsergebnisse variierten. Dies war wahrscheinlich auf die Verunreinigung des Proteinflecks von L10 im zweidimensionalen Gel durch die Proteine L8/9 zurückzuführen. Das Protein L11 band in meinen Versuchen stets an die 13S RNS. In den mit 1,6 M KCl behandelten Ribonukleoproteinen war es ebenfalls ausschließlich im 13S RNP nachweisbar.

Zusammenfassend ergibt sich, daß von den 16 Proteinen, die Spierer und Zimmermann der 13S oder der 18S RNS zuordnen, 13 mit meinen Resultaten übereinstimmen. Ein Protein (L10) konnte in meinen Versuchen keinem Fragment eindeutig zugeordnet werden, während die Proteine L11 und L13 in meinen Experimenten nur an die 13S RNS, in denen von Spierer und Zimmermann aber an die 18S RNS banden. Für die übrigen Proteine, die von mir identifiziert wurden (L7/L12, L8/9, L18, L25 und L29), legten Spierer und Zimmermann keine experimentellen Ergebnisse vor. Sie ordneten L7/L12 auf Grund der Nachbarschaft zu den Proteinen L10 und L11 der 18S RNS zu (Highland und Howard, 1974). Meine Ergebnisse zeigen dagegen, daß der Hauptbindungsort von L7/L12 im 13S RNP liegt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß auch Beziehungen zum 18S RNS bestehen (siehe oben und Tabelle 3, E.5.1).

Spierer und Zimmermann (1976) hatten in ihrer letzten Veröffentlichung die primären Bindungsproteine L1, L3, L6 und L23 im mittleren Bereich der 23S RNS eingeordnet, während die Proteine L2 und L16 im letzten Viertel an die 23S RNS binden

sollten. Meine Ergebnisse über die Proteinbindungsorte auf der 11S RNS zeigten aber, daß die Proteine L2 und L16 im zentralen Bereich an die 23S RNS binden, während die Proteine L1 und L3 ihren Bindungsort näher zum 3'-Ende auf der 23S RNS haben.

F.3.3 Die Proteine und die RNS im Bereich der Grenzfläche zur 30S Untereinheit

Übereinstimmend fanden Morrison et al. (1973) und Highland et al. (1974) die Proteine L14, L19, L23 und L27 an der Grenzfläche zur 30S Untereinheit. Morrison et al. (1973) berichteten außerdem, daß Antikörper gegen die Proteine L1, L6, L11, L15, L20 und L26 die Assoziation der 30S und 50S Untereinheiten verhinderten. Die meisten dieser Proteine (L6, L14, L19 und L23) wurden in meinen Versuchen der zentralen Region der 23S RNS zugeordnet. Die Proteine L11 und L20 banden an die 13S RNS und die Proteine L1 und L27 an die 11S RNS. Daraus läßt sich ableiten, daß ein beträchtlicher Teil der 23S RNS - etwa 1000 Nukleotide zwischen den Bindungsorten von L20 und L1 - am Aufbau der Strukturen an der Grenzfläche beteiligt ist. Ob diesem Teil der 23S RNS auch funktionelle Aufgaben bei der Assoziation der ribosomalen Untereinheit zukommt, ist noch unbekannt. Es ist wahrscheinlich, daß der zentrale Bereich der 23S RNS auch am Aufbau des Peptidyltransferase-Zentrums beteiligt ist, da eines der Proteine L2, L6, und L16, die hier an die 23S RNS binden, einen Einfluß auf die Peptidyltransferase ausübt, während sich die beiden anderen in deren Nähe befinden (vgl. B.1.3.9.b).

F.3.4 Die Proteine und die RNS am Bindungsort von EF-G

Im elektronenmikroskopischen Ribosomenmodell wurden die Proteine L7/L12 und L11 in der zentralen Ausstülpung des 50S

Partikels lokalisiert (Tischendorf et al., 1975). An diese bindet der Elongationsfaktor EF-G (vgl. B.1.3.8). Alle drei ribosomalen Proteine bildeten in meinen Versuchen einen Komplex mit der 13S RNS, so daß dieser Teil der 23S RNS in der Nähe des Bindungsortes von EF-G lokalisiert werden kann. Aus der Verknüpfung von L7/L12 mit L5 durch bifunktionelle Reagenzien (Kenny et al., 1975; Expert-Besançon et al.,1975) läßt sich außerdem ableiten, daß der 5S RNS-Protein Komplex nicht weit vom EF-G-Bindungsort entfernt ist.

Legende zu Abbildung 28: Schema der Proteinbindungsorte auf der 23S RNS. Die Ergebnisse in (a) und (b) sind eine Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Experimente: (1) Proteingehalt der 13S und 18S RNPs, (2) Proteingehalt der mit hohen KCl-Konzentrationen behandelten RNPs, (3) Resultate der Rekonstitutionsexperimente mit der 13S, 18S und 11S RNS und (4) Resultate der Bindungstests mit Einzelproteinen. (c) Ergebnisse aus der Literatur über die Bindungsorte von Einzelproteinen (Branlant et al., 1973 und 1975). (d) Ergebnisse von Spierer et al. (1975) über die Bindung von Proteinen an die 13S und die 18S RNS.

Legende zu Abbildung 29: Dissoziationsschema von Proteingruppen bei der Behandlung von 50S Untereinheiten mit unterschiedlichen LiCl-Molaritäten. Die Proteinzusammensetzung der Restpartikel wurde der Arbeit von Homann und Nierhaus (1971) entnommen. Die Dissoziation schreitet hauptsächlich vom 3'-Ende der 23S RNS zum 5'-Ende fort.

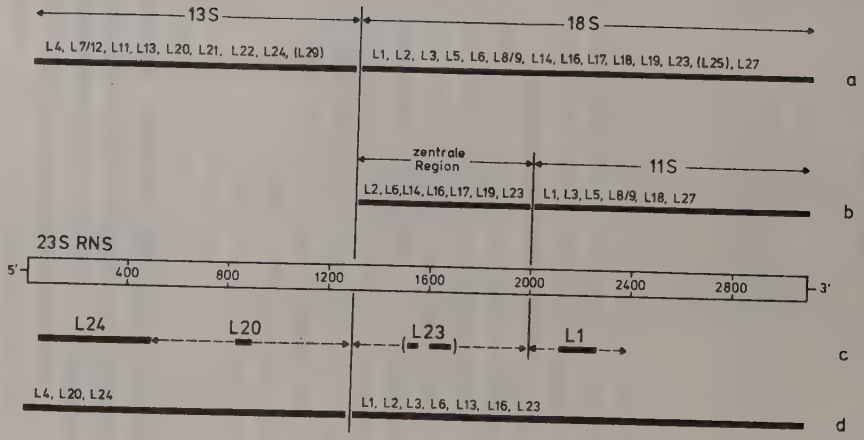


Abbildung 28: Legende siehe Seite 97

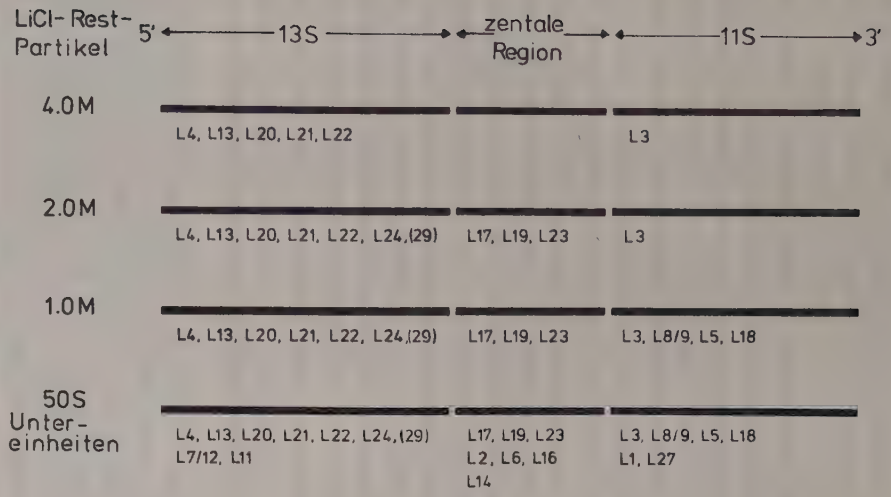


Abbildung 29: Legende siehe Seite 97

F.3.5 Nukleationsorte auf der 23S RNS

Wenn 50S Untereinheiten mit 4 M CsCl und abnehmenden Mg^{2+}-Ionenkonzentrationen oder mit ansteigenden LiCl-Konzentrationen behandelt werden, erfolgt die Dissoziation der Proteine kooperativ in diskreten Gruppen. Diese Proteine sind von Homann und Nierhaus (1971) identifiziert worden und korrelieren gut mit meinen Daten über die Bindungsorte der Proteine auf der 23S RNS (Abb. 29). Beim Übergang von 0 bis 1 M LiCl dissoziieren Proteine von allen drei Bereichen der 23S RNS, während bei höheren Molaritäten die Proteine in Gruppen fortschreitend vom 3'- zum 5'-Ende der 23S RNS dissoziieren. Die Proteine am 5'-Ende und das Protein L3 sind am festesten an die 23S RNS gebunden; es folgen die Proteine in der mittleren Region und schließlich die Proteine am 3'-Ende. Die Resistenz einer Gruppe von Proteinen am 13S Fragment der 23S RNS gegenüber der Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen deutet darauf hin, daß am 5'-Ende ein fester "Kern" aus Proteinen und der RNS gebildet wird, um den sich der Rest der Proteine und der RNS strukturiert. Ähnlich wie auf der 16S RNS (Zimmermann, 1974) ist es denkbar, daß sich auf der 23S RNS drei Nukleationsorte befinden, von denen ausgehend der Aufbau des 50S Partikels aus Proteinen und der RNS beginnt. Es sind dies: Erstens der Nukleationsort auf der 13S RNS, zweitens, der Nukleationsort im zentralen Bereich der 23S RNS und drittens, der Nukleationsort auf dem 11S Fragment.

In in vivo Versuchen analysierten Pichon et al. (1972), in welcher Reihenfolge die Proteine während der Biosynthese des 50S Partikels an die 23S RNS angelagert werden. Sie unterschieden fünf Gruppen: Als erste Gruppe wurden die Proteine L3, L4, L13, L21, L22, L23, L24 sowie die Proteine L5 und L18, die an die 5S RNS binden, in das Vorläuferpartikel inkorporiert. Von sieben Proteinen, die nach diesen Versuchen zuerst an die 23S RNS banden, gehörten fünf zur 13S RNS. Nur die beiden primären Bindungsproteine L3 und L23 banden sehr früh an die 18S RNS. Mit Ausnahme des Proteins L29, das

an die 13S RNS bindet, banden alle Proteine, die von Pichon et al. (1972) in die zweite Gruppe eingeordnet und bisher von mir lokalisiert wurden (L2, L16, L17 und L19), an die zentrale Region der 23S RNS. In den späteren Phasen der Biosynthese des 50S Partikels wurden Proteine an alle Regionen der 23S RNS angelagert.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse wie folgt verstehen: Da die Anlagerung der Proteine des 50S Partikels bereits während der Transkription der Vorläufer-RNS erfolgt (Mangiarotti et al., 1968), beginnt die Komplexbildung der Proteine mit der 23S RNS vom 5'-Ende her und setzt sich zum 3'-Ende fort. Wahrscheinlich wird die Komplexbildung nacheinander an drei Nukleationsorten initiiert, an die zuerst die primären Bindungsproteine angelagert werden und später diejenigen Proteine, die die primären Bindungsproteine für ihren Einbau benötigen. Als Konsequenz der Proteinanlagerung vom 5'- zum 3'-Ende ist die Verteilung der Proteine im fertigen 50S Partikel unsymmetrisch, so daß das Protein L24 direkt am 5'-Ende der 23S RNS bindet, während bisher kein Protein gefunden wurde, das im Bereich der letzten 700 Nukleotide an die 23S RNS bindet.

F.3.6 Die dreidimensionale Struktur des 50S Partikels

In dem Ribosomenmodell, das von Tischendorf et al. (1975) entwickelt worden ist, ist das 50S Partikel globulär mit drei "Ausstülpungen" dargestellt worden (Abb. 30). Zwei dieser "Ausstülpungen", die "rechte Armlehne " und die "Rückenlehne" des "Sessels" können zwei der drei großen Fragmente der 23S RNS auf Grund folgender Daten zugeschrieben werden:

1. Am Aufbau der "Rückenlehne" ist das 13S Fragment beteiligt, da in ihm die Proteine L4, L7/L12, L11 und L22 lokalisiert wurden.
2. Die "rechte Armlehne" wird von der 11S RNS und den Proteinen L1 und L18 und möglicherweise weiteren Proteinen,

die im Ribosomenmodell noch nicht identifiziert worden sind, gebildet.

3. Proteine, die zwischen den Nukleotiden 1300 und 2000 an die 23S RNS binden, befinden sich auf der rechten Seite des "Sessels" in der Vertiefung zwischen der "rechten Armlehne" und der "Rückenlehne".

Wahrscheinlich sind die drei großen Fragmente der 23S RNS zusammen mit den an sie bindenden Proteinen im Ribosom so gegeneinander versetzt, daß in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein globuläres Partikel zu sehen ist, aus dem mehrere "Ausstülpungen" herausragen.

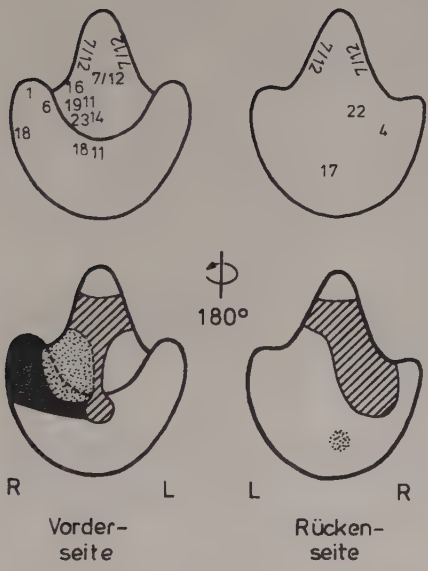


Abbildung 30: Drei Bereiche innerhalb der ribosomalen 50S Untereinheit, die von Proteinen eingenommen werden, die sich entweder an die 13S RNS (gestrichelte Region), die zentrale Region der 23S RNS (getüpfelte Region) oder die 11S RNS (geschwärzte Region) anlagern. Das dreidimensionale Modell der 50S Untereinheit wurde der Arbeit von Tischendorf et al. (1975) entnommen.

G. Literaturverzeichnis

Allet, B. and P.F. Spahr
Binding sites of ribosomal proteins on two specific fragments derived from E. coli 50S ribosomes.
Eur. J. Biochem. 19, 250-255 (1971)

Acharya, A.S., P.B. Moore and F.M. Richards
Crosslinking of elongation factor EF-G to the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli.
Biochemistry 12, 3108-3114 (1973)

Amons, R., W. Möller, E. Schiltz and J. Reinbolt
Studies on the binding sites of protein S4 to 16S RNA in Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 41, 135-138 (1974)

Amons, R. and W. Möller
Reductive-methylation studies on L7 and L12 ribosomal proteins.
Eur. J. Biochem. 44, 97-103 (1974)

Barrell, B.G.
Fractionation and sequence analysis of radioactive nucleotides.
Procedures in Nucleic Acid Research 2, 751-779 (1971)

Bitar, K.G.
The primary structure of the ribosomal protein L29 from Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 386, 99-106 (1974)

Bitar, K.G. and B. Wittmann-Liebold
The primary structure of the 5S rRNA binding protein L25 of Escherichia coli ribosomes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1343-1352 (1975)

Branlant, C., A. Krol, J. Sriwidada, P. Fellner and R.Crichton
The identification of the RNS binding site for a 50S ribosomal protein by a new technique.
FEBS Lett. 35, 265-272 (1973)

Branlant, C., A. Krol, J. Sriwidada, J.P. Ebel, P. Sloof and R. Garrett
A partial localization of the binding sites of the 50S subunit proteins L1, L20 and L23 on 23S ribosomal RNA of Escherichia coli.
FEBS Lett. 52, 195-201 (1975a)

Branlant, C., J. Sriwidada, A. Krol, P. Fellner and J.P. Ebel
Nucleotide sequences of the T_1 and pancreatic ribonuclease digestion products from some large fragments of the 23S RNA of Escherichia coli.
Biochimie 57, 175-225 (1975b)

Brosius, J., E. Schiltz and R. Chen
The primary structure of the 5S RNS binding protein L18 from Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 56, 359-361 (1975)

Brosius, J. and R. Chen
The primary structure of protein L16 located at the peptidyltransferase center of Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. (1976), im Druck

Brot, N. and H. Weissbach
The enzymatic acetylation of E. coli ribosomal protein L12.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 673-679 (1972)

Brownlee, G.G.
Determination of sequences in RNA.
in: Work, T.S. and E. Work, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.
North-Holland Publishing Company (1972)

Brownlee, G.G., F. Sanger and B.G. Barrell
The sequence of 5S rRNA.
J. Mol. Biol. 34, 397-412 (1968)

Chang, F.N.
Conformational changes in ribosomal subunits following dissociation of the Escherichia coli 70S ribosome.
J. Mol. Biol. 78, 563-568 (1973)

Chen, R. and G. Ehrke
The primary structure of the 5S RNS binding protein L5 of Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. (1976a), im Druck

Chen, R. and G. Ehrke
The primary structure of protein L34 from the large ribosomal subunit of Escherichia coli.
FEBS Lett. 63, 215-219 (1976b)

Chen, R., L. Mende and U. Arfsten
The primary structure of protein L27 from the peptidyl--tRNA binding site of Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 59, 96-99 (1975)

Chen, R., J. Brosius, B. Wittmann-Liebold and H. Schäfer
Occurrence of methylated amino acids as N-termini of proteins from Escherichia coli ribosomes.
J. Mol. Biol. (1976), im Druck

Chu, F.K. and P.Y. Maeba
Reconstitution of 48S particles with subunit association activity from Escherichia coli 50S ribosomal components.
Can. J. Biochem. 53, 844-854 (1975)

Clegg, C. and D. Hayes
Identification of neighbouring proteins in the ribosome of Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 42, 21-28 (1974)

Conway, G.R. and F. Lipmann
Characterization of a ribosome-linked guanosine triphosphate in Escherichia coli extracts.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52, 1462-1469 (1964)

Czernilofsky, A.P., E.E. Collatz, G. Stöffler and E. Kuechler
Proteins at the tRNA binding sites of Escherichia coli ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 230-234 (1974a)

Czernilofsky, A.P., G. Stöffler and E. Küchler
Messenger-RNA-abhängige Affinitätsmarkierung der 50S Untereinheit des Escherichia coli Ribosoms.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 89-92 (1974b)

Dieijen, G. van, P.H. van Knippenberg and J. van Duin
The specific role of ribosomal protein S1 in the recognition of native phage RNA.
Eur. J. Biochem. 64, 511-518 (1976)

Dovgas, N.V., L.F. Markova, T.A. Mednikova, L.M. Vinukov, Yu.B. Alakhov and Yu.A. Ovchinnikov
The primary structure of the 5S RNS binding protein L25 from Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 53, 351-354 (1975)

Dovgas, N.V., L.M. Vinukov, J.S. Velmoga, Yu.B. Alakhov and Yu.A. Ovchinnikov
The primary structure of protein L10 from Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 67, 58-61 (1976)

Dzionara, M., E. Kaltschmidt and H.G. Wittmann
Ribosomal proteins. XIII. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of Escherichia coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1909-1913 (1970)

Eickenberry, E.F., T.A. Bickel, R.R. Traut and L.A. Price
Separation of large quantities of ribosomal subunits by zonal ultracentrifugation.
Eur. J. Biochem. 12, 113-116 (1970)

Eilat, D., M. Pellegrini, H. Oen, Y. Lapidot and C.R. Cantor
A chemical mapping technique for exploring the location of proteins along the ribosome bound peptide chain.
J. Mol. Biol. 88, 831-840 (1974)

Erdmann, V.A.
Structure and function of 5S and 5.8S RNA.
in: W.E. Cohn, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 18, Academic Press, im Druck

Expert-Besançon, A., M.-F. Guérin, D.E. Hayes, L. Legault and J. Thibault
Preparation of E. coli ribosomal subunits without loss of biological activity.
Biochimie 56, 77-89 (1974)

Expert-Besançon, A., D. Barritault, J.C.S. Clegg, M. Milet, Y. Khouvine and D.H. Hayes
Identification of neighbouring proteins in E. coli 50S ribosomes.
FEBS Lett. 59, 64-69 (1975)

Fahnestock, S.R.
Evidence of the involvement of a 50S ribosomal protein in several active sites.
Biochemistry 14, 5321-5327 (1975)

Fellner, P.
Nucleotide sequences from specific areas of the 16S and 23S ribosomal RNA's of E. coli.
Eur. J. Biochem. 11, 12-27 (1969)

Fellner, P. and J.P. Ebel
Observation on the primary structure of the 23S ribosomal RNA from E. coli.
Nature 225, 1131-1132 (1970)

Feunteun, J. and R. Monier
Accessibility of 5S RNS to ribonucleases in Escherichia coli ribosomes.
Biochimie 53, 657-660 (1971)

Feunteun, J., R. Monier, R. Garrett, M. Le Bret and J.B. Le Pecq
Effects of 50S subunit proteins L5, L18 and L25 on the fluorescence of 5S RNS-bound ethidium bromide.
J. Mol. Biol. 93, 535-541 (1975)

Garrett, R.A., K.H. Rak, L. Daya and G. Stöffler
Specific protein binding sites on 16S RNS of Escherichia coli.
Molec.gen.Genet. 114, 112-124 (1971)

Garrett, R.A. and H.G. Wittmann
Structure and function of the ribosome.
Endeavour 32, 8-14 (1973)

Garrett, R.A., S. Müller, P. Spierer and R.A. Zimmermann
Binding of 50S ribosomal subunit proteins to 23S RNA of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 88, 553-557 (1974a)

Garrett, R.A., C. Schulte, G. Stöffler, P. Gray and R. Monier
The release of proteins and 5S RNS during the unfolding of Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 49, 1-4 (1974b)

Gaunt-Klöpfer, M. and V.A. Erdmann
ATPase and GTPase activities associated with the 5S RNA -protein complex of Escherichia coli ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 390, 226-230 (1975)

Gesteland, R.F.
Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of E. coli.
J. Mol. Biol. 16, 67-84 (1966)

Gray, P.N. and R. Monier
Partial localization of the 5S RNA binding site on 23S RNA.
Biochimie 54, 41-45 (1972)

Gray, P.N., R.A. Garrett, G. Stöffler and R. Monier
An attempt at the identification of the proteins involved in the incorporation of 5S RNA during 50S ribosomal subunit assembly.
Eur. J. Biochem. 28, 412-421 (1972)

Gray, P.N., G. Bellemare, R. Monier, R.A. Garrett and G. Stöffler
Identification of the nucleotide sequences involved in the interaction between Escherichia coli 5S RNA and specific 50S subunit proteins.
J. Mol. Biol. 77, 133-152 (1973)

Hardy, S.J.S., C.G. Kurland, P. Voynow and G. Mora
The ribosomal proteins of Escherichia coli. I: Purification of the 30S ribosomal proteins.
Biochemistry 8, 2897-2905 (1969)

Hardy, S.J.S.
The stoichiometry of the ribosomal proteins of Escherichia coli.
Molec.gen.Genet. 140, 253-274 (1975)

Highland, J.H. and G.A. Howard
Assembly of ribosomal proteins L7, L10, L11 and L12 on the 50S subunit of Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 250, 831-834 (1975)

Hill, W.E., J.D. Thompson and J.W. Anderegg
X-ray scattering study of ribosomes from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 44, 89-102 (1969)

Hindennach, I., E. Kaltschmidt and H.G. Wittmann
Ribosomal proteins. Isolation of proteins from 50S ribosomal subunits of Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 23, 12-16 (1971)

Homann, H.E. and K.H. Nierhaus
Ribosomal proteins. Protein composition of biosynthetic precursors and artificial subparticles from ribosomal subunits in Escherichia coli K12.
Eur. J. Biochem. 20, 249-257 (1971)

Horne, J.R. and V.A. Erdmann
Isolation and characterization of 5S RNA-protein complexes from Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli.
Molec.gen. Genet. 119, 337-344 (1972)

Horne, J.R. and V.A. Erdmann
ATPase and GTPase activities associated with a specific 5S RNA-protein complex.
Proc.Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2870-2873 (1973)

Hsiung, N. and C.R. Cantor
Reaction of celite-bound fluorescein isothiocyanate with the 50S E. coli ribosomal subunit.
Arch. Biochem. Biophys. 157, 125-132 (1973)

Hsiung, N., S.A. Reines and C.R. Cantor
Investigation of the ribosomal peptidyl transferase center using a photoaffinity label.
J. Mol. Biol. 88, 841-855 (1974)

Kagawa, H., L. Jishuken and H. Tokimatsu
Linear sequence of proteins of Escherichia coli 50S ribosomal proteins.
Nature New Biol. 237, 74-76 (1972)

Kaltschmidt, E. and H.G. Wittmann
Ribosomal proteins. VII: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins.
Analyt. Biochem. 36, 401-412 (1970a)

Kaltschmidt, E. and H.G. Wittmann
Ribosomal proteins. XII: Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1276-1282 (1970b)

Kaltschmidt, E., M. Dzionara and H.G. Wittmann
Ribosomal proteins. XV: Amino acid compositions of isolated ribosomal proteins from 30S and 50S subunits of Escherichia coli.
Molec. gen. Genet. 109, 292-297 (1970)

Kenny, J., A. Sommer and R.R. Traut
Cross-linking studies on the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli with methyl 4-mercaptobutyrimidate.
J. Biol. Chem. 250, 9434-9436 (1975)

Kurland, C.G.
Molecular characterization of ribonucleic acid from Escherichia coli ribosomes.
J. Mol. Biol. 2, 83-91 (1960)

Lake, J.A., M. Pendergast, L. Kahan and M. Nomura
Localization of Escherichia coli ribosomal proteins S4 and S14 by electron microscopy of antibody-labelled subunits.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4688-4692 (1974)

Lake, J.A.
Ribosome structure determined by electron microscopy of Escherichia coli small subunits, large subunits and monomeric ribosomes.
J. Mol. Biol. 105, 131-159 (1976)

Lengyel, P.
The process of translation: a bird's-eye view.
in: Ribosomes (1974), Hrsg.: Nomura, Tissières u. Lengyel, Cold Spring Harbor Laboratory

Litman, D.J. and C.R. Cantor
Surface topography of the Escherichia coli ribosome. Enzymatic iodination of the 50S subunit.
Biochemistry 13, 512-518 (1974)

Lowry, H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Lucas-Lenard, J. and L. Beres
Proteins synthesis - peptide chain elongation.
in: The enzymes, Vol. 10 (1974)
Hrsg.: P.D. Boyer, Academic Press

Maassen, J.A. and W. Möller
Identification by photo-affinity labeling of the proteins in Escherichia coli ribosomes involved in elongation factor G-dependent GDP binding.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1277-1280 (1974)

Mangiarotti, G., D. Apirion, D. Schlessinger and L. Silengo
Biosynthetic precursors of 30S and 50S ribosomal particles in Escherichia coli.
Biochemistry 7, 456-471 (1968)

Means, G.E. and R.E. Feeney
Reductive alkylation of amino groups in proteins.
Biochemistry 7, 2192-2201 (1968)

Michalski, C.J., B.H. Sells and M. Morrison
Molecular morphology of ribosomes. Localisation of ribosomal proteins in 50S subunits.
Eur. J. Biochem. 33, 481-485 (1973)

Michalski, C.J. and B.H. Sells
Molecular morphology of ribosomes. Iodination of Escherichia coli ribosomal proteins with solid-state lactoperoxidase.
Eur. J. Biochem. 52, 385-389 (1975)

Möller, W.
The ribosomal components involved in EF-G and EF-Tu-dependent GTP hydrolysis.
in: Ribosomes (1974), Hrsg.: Nomura, Tissières und Lengyel, Cold Spring Harbor Laboratory

Monier, R.
5S RNA.
in: Ribosomes (1974), Hrsg.: Nomura, Tissières und Lengyel, Cold Spring Harbor Laboratory

Moore, P.B.
Reaction of N-ethyl maleimide with ribosomes of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 60, 169-184 (1971)

Moore, G. and R.R. Crichton
Reductive methylation: a method for preparing functionally active radioactive ribosomes.
FEBS Lett. 37, 74-78 (1973)

Moore, P.B., D.M. Engelmann and B.P. Schoenborn
Neutron scattering studies of the E. coli ribosome.
in: Ribosomes (1974), Hrsg.: Nomura, Tissières und Lengyel, Cold Spring Harbor Laboratory

Moore, V.G., R.E. Atchison, G. Thomas, M. Moran and H. Noller
Identification of a ribosomal protein essential for peptidyltransferase activity.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 844-848 (1975)

Mora, G., D. Donner, P. Thammana, L. Lutter, C.G. Kurland and G.R. Craven
Purification and characterization of 50S ribosomal proteins of Escherichia coli.
Molec. gen. Genet. 112, 229-242 (1971)

Morrison, C.A., R.A. Garrett, H. Zeichhardt and G. Stöffler
Proteins occurring at or near the subunit interface of E. coli ribosomes.
Molec. gen. Genet. 127, 359-368 (1973)

Morrison, C.A.
Eine Untersuchung über die Topographie von Proteinen im Ribosom des Bakteriums Escherichia coli mit Hilfe protein-spezifischer Antikörper und analytischer Ultrazentrifugation.
Dissertationsarbeit. Freie Universität Berlin (1974)

Muto, A., C. Ehresmann, P. Fellner and R.A. Zimmermann
RNA-protein interactions in the ribosome. I. Characterization and ribonuclease digestion of 16S RNA-ribosomal protein complexes.
J. Biol. Chem. 86, 411-432 (1974)

Newton, I. and R. Brimacombe
Two specific ribonucleoprotein fragments from the 50S subparticle of Escherichia coli ribosomes.
Eur. J. Biochem. 48, 513-518 (1974)

Newton, I., J. Rinke and R. Brimacombe
Random exchange of ribosomal proteins in EDTA-subparticles
FEBS Lett. 51, 215-218 (1975)

Nierhaus, K. and V. Montejo
A protein involved in the peptidyltransferase activity of Escherichia coli ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1931-1935 (1973)

Nomura, M. and V.A. Erdmann
Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components.
Nature 228, 744-748 (1970)

Ochoa, S. and R. Mazumder
Polypeptide chain initiation.
in: The enzymes, Vol. 10 (1974), Hrsg.: P.D. Boyer, Academic Press

Oen, H., M. Pellegrini, D. Eilat and C.R. Cantor
Identification of 50S proteins at the peptidyl-tRNA binding site of Escherichia coli ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2799-2803 (1973)

Pellegrini, M., H. Oen and C.R. Cantor
Covalent attachment of a pepdidyl-transfer RNA analog to the 50S subunit of Escherichia coli ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 837-841 (1972)

Pettersson, I., S.J.S. Hardy and A. Liljas
The ribosomal protein L8 is a complex of L7/L12 and L10.
FEBS Lett. 64, 135-138 (1976)

Pichon, J., J. Marvaldi and G. Marchis-Mouren
The in vivo order of addition of ribosomal proteins in the course of E. coli subunit biogenesis.
Biochem. Biophys. Re. Comm. 47, 531-538 (1972)

Pongs, O., R. Bald, T. Wagner and V.A. Erdmann
Irreversible binding of N-iodoacetylpuromycin to E. coli ribosomes.
FEBS Lett. 35, 137-140 (1973a)

Pongs, O., R. Bald and V.A. Erdmann
Identification of chloramphenicol binding protein in Escherichia coli ribosomes by affinity labeling.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2229-2233 (1973b)

Pongs, O., K.H. Nierhaus, V.A. Erdmann and H.G. Wittmann
Active sites in Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 40, 28-37 (1974)

Rice, R.H. and G.E. Means
Radioactive labeling of proteins in vitro
J. Biol. Chem. 246, 831-832 (1971)

Rinke, J., A. Yuki and R. Brimacombe
Studies on the environment of protein S7 within the 30S subunit of E. coli ribosomes.
Eur. J. Biochem. 64, 77-89 (1976)

Ritter, E. and B. Wittmann-Liebold
The primary structure of protein L30 from Escherichia coli ribosomes.
FEBS Lett. 60, 153-155 (1975)

Rosset, R. and R. Monier
A propos de la présence d'acide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'E.coli.
Biochim. Biophys. Acta 68, 653-656 (1963)

Roth, H.E. and K.H. Nierhaus
Structural and functional studies of ribonucleoprotein fragments isolated from Escherichia coli 50S ribosomal subunits.
J. Mol. Biol. 94, 111-121 (1975)

Saha, B.K.
Cleavage of 23S RNA in 50S ribosomes into a 5'-terminal and a 3'-terminal fragment by pancreatic ribonuclease.
Biochim. Biophys. Acta 353, 292-300 (1974)

Schrier, P.I. and W. Möller
The involvement of 50S ribosomal protein L11 in the EF-G dependent GTP hydrolysis.
FEBS Lett. 54, 130-134 (1975)

Schulte, C. and R.A. Garrett
Optimal conditions for the interaction of ribosomal protein S8 and 16S RNA and studies on the reaction mechanism.
Molec. gen. Genet. 119, 345-355 (1972)

Schulte, C., C.A. Morrison and R.A. Garrett
Protein-ribonucleic acid interactions in Escherichia coli ribosomes. Solution studies on S4-16S ribonucleic acid and L24-23S ribonucleic acid binding.
Biochemistry 13, 1032-1037 (1974)

Shine, J. and L. Delgarno
The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1342-1346 (1974)

Spierer, P., R.A. Zimmermann and G.A. Mackie
RNA-protein interactions in the ribosome. Binding of 50S subunit proteins to 5' and 3' terminal segments of the 23S RNA.
Eur. J. Biochem. 52, 459-468 (1975)

Spierer, P. and R.A. Zimmermann
RNA-protein interactions in the ribosome. VIII. Cooperative interactions in the 50S subunit of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 103, 647-653 (1976)

Spirin, A.S. and L.P. Gavrilova
The ribosome. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Springer Verlag (1969)

Steitz, J. and K. Jakes
How ribosomes select initiator regions in mRNA: Base pair formation between the 3'terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in Escherichia coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4734-4738 (1975)

Stöffler, G., L. Daya, K.H. Rak and R.A. Garrett
Specific protein binding sites on 23S RNA of Escherichia coli.
Molec. gen. Genet. 114, 125-133 (1971a)

Stöffler, G., L. Daya, K.H. Rak and R.A. Garrett
The number of specific protein binding sites on 16S and 23S RNA of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 62, 411-414 (1971b)

Stöffler, G.
Structure and function of the Escherichia coli ribosome: immunochemical analysis.
in: Ribosomes (1974), Hrsg.: Nomura, Tissières u. Lengyel, Cold Spring Harbor Laboratory

Stöffler, G. and G.W. Tischendorf
Antibiotic receptor sites in Escherichia coli ribosomes.
Topics in Infectious Deseases 1, 117-143 (1974)

Stuhrmann, H.B., J. Haas, K. Ibel, B. de Wolf, M.H.J. Koch, R. Parfait and R.R. Crichton
New low resolution model for 50S subunit of Escherichia coli ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 2379-2383

Tate, W.P. and C.T. Caskey
Polypeptide chain termination.
in: The enzymes, Vol. 10 (1974)
Hrsg.: P.D. Boyer, Academic Press

Terhorst, C., W. Möller, R. Laursen and B. Wittmann-Liebold
Amino acid sequence of a 50S ribosomal protein involved in both EF-G and EF-T dependent GTP-hydrolysis.
FEBS Lett. 28, 325-328 (1972)

Tischendorf, G.W., H. Zeichhardt and G. Stöffler
Architecture of the Escherichia coli ribosome as determined by immune electron microscopy.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4820-4824 (1975)

Tissières, A., J.D. Watson, D. Schlessinger and B.R. Hollingworth
Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 1, 221-233 (1959)

Traut, R.R. and R. Monro
The puromycin reaction and its relation to protein synthesis.
J. Mol. Biol. 10, 63-72 (1964)

Wabl, M.R.
Electron microscopic localization of two proteins on the surface of the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli using specific antibody markers.
J. Mol. Biol. 84, 241-247 (1974

Weber, H.J.
Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from Escherichia coli.
Molec. gen. Genet. 119, 233-248 (1972)

Weber, K. and M. Osborn
The reliability of molecular weight determinations by the dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

Wittmann, H.G., G. Stöffler, I. Hindennach, C.G. Kurland, L. Randall-Hazelbauer, E.A. Birge, M. Nomura, E. Kaltschmidt, S. Mizushima, R.R. Traut and T.A. Bickle
Correlation of 30S ribosomal proteins of Escherichia coli isolated in different laboratories.
Molec. gen. Genet. 111, 327-333 (1971)

Wittmann, H.G.
The seventh Sir Hans Krebs lecture "Structure, function and evolution of ribosomes".
Eur. J. Biochem. 61, 1-13 (1976)

Wittmann-Liebold, B., B. Greuer and R. Pannenbecker
The primary structure of protein L32 from the 50S subunit of Escherichia coli ribosomes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1977-1979 (1975)

Wittmann-Liebold, B. and R. Pannenbecker
Primary structure of protein L33 from the large subunit of the Escherichia coli ribosome.
FEBS Lett. (1976) im Druck

Wittmann-Liebold, B., E. Marzinzig and A. Lehmann
Primary structure of protein S20 from the small ribosomal subunit of Escherichia coli.
FEBS Lett. (1976) im Druck

Yu, R.S.T. and H.G. Wittmann
The sequence of steps in the attachment of 5S RNA to cores of Escherichia coli ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 324, 375-385 (1973)

Zimmermann, R.A., A. Muto, P. Fellner, E. Ehresmann and C. Branlant
Location of ribosomal protein binding sites on 16S ribosomal RNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1282-1286 (1972)

Zimmermann, R.A.
RNA-protein interactions in the ribosomes.
in: Ribosomes (1974), Hrsg.: Nomura, Tissières u. Lengyel, Cold Spring Harbor Laboratory

L e b e n s l a u f

Am 28.September 1948 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Alfred Schmeißer und seiner Frau Anneliese, geb. Quest, in Bad Salzuflen (Nordrhein-Westfalen) geboren. Nach vierjährigem Grundschulbesuch und bestandener Aufnahmeprüfung besuchte ich das Neusprachliche Mädchengymnasium in Bad Salzuflen, wo ich im Jahr 1967 die Reifeprüfung erfolgreich bestand. Da mein Vater im gleichen Jahr starb, begann ich erst 1968 mit dem Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
Im Jahr 1972 bis zum Frühjahr 1973 fertigte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München unter der Leitung von Herrn Professor G. Braunitzer meine Diplomarbeit an. Im gleichen Jahr heiratete ich Herrn Dr. Robert Chen aus Taiwan. Im Herbst 1973 gingen wir nach Berlin, wo ich im Oktober mit meiner Dissertationsarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik unter der Leitung von Herrn Professor H.G. Wittmann begann.

D a n k s a g u n g

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik durchgeführt. Herrn Professor Dr. H.G. Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R.A. Garrett für die Überlassung des Themas und die Einführung in das Arbeitsgebiet der Protein-RNS Wechselwirkung. Der ganzen Gruppe sei für die schöne Zusammenarbeit gedankt, insbesondere Herrn E. Ungewickell für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30